

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS UND **WILLIAM SEIFRIZ**
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK UND **FRIEDL WEBER**
ROSTOCK GRAZ

BAND XLII, HEFT 3
MIT 29 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 27. APRIL 1963



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1953

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,
Graz, Schubertstraße 51, Österreich

oder an

Prof. Dr. J. Spek, Zoologisches Institut,
(3a) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, DDR

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 5,
Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezieher der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostensersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLII. Band

Inhaltsverzeichnis

3. Heft

Abhandlungen

Seite

Wunderly, Ch., und H. Gloor: Versuche zur Charakterisierung der larvalen Blutproteine normaler und letaler Genotypen von <i>Drosophila</i> mittels Papier-Elektrophorese.....	273
Weber, F.: Eiweißpolyeder in <i>Pereskiopsis</i> -Virussträgern.....	283
Mevius, W. sen., und D. Düvel: Die Grana-Anordnung in Chloroplasten.....	287
Pfeiffer, H. H.: Doppelbrechung und Orientierungsrate der Leptonen fließenden Protoplasmas.....	291
Höffler, K., und H. Schindler: Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien.....	296
Dianellidis, Th., und K. Umrath: Über das elektrische Potential und über den Erregungsvorgang bei dem Myxomyceten <i>Physarum polycephalum</i>	312
Schittengruber, Brigitte: Das Anthoorphinin der Kompositen-Involukrallblätter fehlt ihren Schließzellen.....	324
Schittengruber, Brigitte: Kontraktion Anthoorphinin-haltiger Vakuolen.....	328

Kurze Mitteilung

Höffler, K.: Zur Frage des Plasmalemmas bei <i>Spirogyra</i>	334
--	-----

Referate.....	343
---------------	-----

6

3

1

Versuche zur Charakterisierung der larvalen Blutproteine normaler und letaler Genotypen von *Drosophila* mittels Papier-Elektrophorese

Von

Ch. Wunderly und H. Gloor

Aus der Medizinischen Universitätsklinik, Zürich, und dem Zoologisch-vergleichenden anatomischen Institut der Universität Zürich

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 15. Dezember 1952)

I. Einleitung

Für die Untersuchung von Mutationen mit morphologisch faßbarem Effekt ist eine möglichst genaue Analyse der sichtbaren phänotypischen Abweichungen der Mutante von der Normalform (= Wildtyp) erste Voraussetzung. Dabei hat sich in mehreren Fällen, insbesondere auch bei der Bearbeitung von Letalfaktoren von *Drosophila* (Hadorn 1948), herausgestellt, daß die Genwirkungen im Endeffekt in komplizierte pleiotrope Muster ausmünden. Die unbekannten genphysiologischen Grundlagen dieser Musterbildungen dürften sich in faßbaren Abweichungen des Stoffwechsels und der chemischen Komponenten äußern. Der Nachweis stofflicher Veränderungen könnte für das Studium von Letalfaktoren und somit einer Kategorie, welche dank ihrer physiologischen und morphologischen Wirkungen besonders eindrucksvolle Mutationen aufweist, aufschlußreich sein.

Eine Hauptschwierigkeit für die chemische Untersuchung von *Drosophila*-Mutanten bilden die quantitativ sehr geringen Mengen verfügbaren Materials. Es kommen deshalb in erster Linie Mikromethoden in Frage, wie die von Hadorn und Mitchell (1951) erfolgreich auf *Drosophila* angewandte Papierchromatographie.

Die vorliegende Arbeit ist ein Versuch, mit Hilfe von Papierelektrophorese die Blutproteine in den folgenden zwei Letalmutanten von *Drosophila* zu charakterisieren und eventuelle quantitative Abweichungen vom normalen Blut nachzuweisen:

1. letal-translucida (ltr; 5–20.7), *Drosophila melanogaster*.

Die homozygoten Individuen sterben größtenteils in einem frühen Puppenstadium. Ausnahmsweise kann die Metamorphose weitgehend durchgeführt wer-

den, ohne aber den Zustand einer lebensfähigen Imago jemals zu erreichen. Von den zahlreichen sichtbaren Phänen, die bei dieser Mutante nachzuweisen sind (Hadorn 1949), ist das auffallendste und vor allem auch für die Larven kennzeichnende Merkmal eine Zunahme der Blutflüssigkeit (Hämolymphe), die eine enorme Aufblähung der Tiere zur Folge hat. Die letalen Larven sind somit im Stadium der Verpuppungsreife, das gegenüber normalen Larven mit einer Verspätung von mindestens 24 Stunden (bei 25°) erreicht wird, größer und viel schwerer als Normaltiere. Das Trockengewicht erfährt dabei keine Zunahme. Eine vorläufige Untersuchung (Gloor 1949) zeigt jedoch, daß der Salzgehalt erhöht ist und daß bei geringerer Konzentration die Zusammensetzung der Blutproteine verändert zu sein scheint. Aus dem papierchromatographischen Test geht andererseits hervor, daß in der letalen Hämolymphe nicht nur die Gesamtmenge der Aminosäuren und Peptide, sondern auch deren Konzentration erhöht ist (Hadorn und Stumm-Zollinger, unveröffentlicht).

2. letal-polyploid (lpl.), *Drosophila hydei*.

Die homozygoten Individuen sterben zum Teil als voll ausgewachsene Larven, zum Teil als Vorpuppen, ohne über das Stadium der eigentlichen Verpuppung hinauszukommen. Größe und Wachstumsgeschwindigkeit der letalen Larven sind im ganzen normal, lediglich voll ausgewachsene Individuen werden durchschnittlich etwas schwerer als Normallarven und enthalten dementsprechend etwas mehr Blut.

II. Material und Methoden

Das Blut wurde in der folgenden Weise gewonnen: Voll ausgewachsene, verpuppungsreife Larven wurden aus dem Futter herausgelesen, mehrmals in Leitungswasser gewaschen und anschließend in 70%igem Alkohol kurz sterilisiert (ca. 1 Minute). Nach einer nochmaligen Waschung in dest. Wasser wurden die Larven auf Filterpapier getrocknet. Die so präparierten Tiere wurden entweder einzeln oder in kleinen Gruppen von ca. fünf Individuen auf Objektträgern seziiert, die durch Silikon-Überzug wasserabstoßend gemacht worden waren. Als geeignetste Instrumente zum Öffnen der Tiere erwiesen sich feine Uhrmacherpinzetten. Es mußte darauf geachtet werden, eine genügend große Öffnung in die Haut zu reißen, ohne die inneren Organe stark zu beschädigen und insbesondere ohne den Darm zu verletzen. Nur so war es möglich, die Hämolymphe einigermaßen rein, d. h. ohne nennenswerte Beimengung von Gewebefragmenten und Darminhalt, zu erhalten. Die ausgetretene Flüssigkeit wurde mit Pipetten von ca. 1/8 mm Öffnung aufgenommen und während der Blutentnahme, die sich jedesmal über mehrere Stunden erstreckte, in einer Kältemischung auf ca. -20° gekühlt. Das so gewonnene Blut wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -34° aufbewahrt.

Mit dem beschriebenen Verfahren kann die Hämolymphe selbstverständlich nicht quantitativ gewonnen werden. Die von je 1000 Larven erhaltenen Blutmengen sind durchschnittlich etwa die folgenden: *D. melanogaster*, normal: 0,08 cm³; letal (ltr): 1,0 cm³. *D. hydei*, normal: 0,6 cm³; letal (lpl): 0,8 cm³.

Die Larven wurden z. T. in Milchflaschen, z. T. in Schalen auf Standardfutter (Maisgrieß — Zucker — Hefe — Agar) bei 25° gezüchtet. Zur Gewinnung der erforderlichen Anzahl von Larven der letal-translucida-Mutante stand ein von Rosin (1949) hergestellter Stamm zur Verfügung, in welchem der Letalfaktor über einer frühletal wirkenden Inversion balanciert ist, so daß in den Zuchten nur phänotypisch normale heterozygote (ltr/In) und homozygot letale (ltr/ltr) auf-

wachsen, wobei die Anzahl der letalen unter günstigen Bedingungen dem theoretisch zu erwartenden Drittel nahekommte. Die Beschaffung von Larven der letal-polyloid-Mutante war in zweifacher Hinsicht erschwert. Erstens stand kein balancierter Stamm zur Verfügung, so daß in jeder Generation die Elterntiere in Einzelpaarzuchten auf ihre Heterozygotie für den lpl-Faktor geprüft werden mußten und außerdem der theoretisch zu erwartende Anteil von letalen Larven nur 25% betrug. Zweitens sind die lpl-Larven äußerlich nicht zu unterscheiden von den normalen Geschwistern und müssen deshalb zur Blutentnahme einzeln unter starker Vergrößerung seziiert werden, damit die Letalität einwandfrei festgestellt werden kann. Als Normallarven wurden in geringem Umfang heterozygote Geschwistertiere aus den gleichen Zuchten verwendet, also ltr / In / lpl / + bei *D. hydei*. Zur Hauptsache wurden jedoch normale Larven aus separaten Zuchten von Wildstämmen entnommen, und zwar von den Wildstämmen: *melanogaster Kairo* und *hydei Zürich*.

III. Untersuchung der Hämolymphe mittels Papier-Elektrophorese

a) Proteinzusammensetzung

Für die Charakterisierung eines unbekannten Gemisches verschiedener Proteine hat sich die Elektrophorese als besonders wertvoll erwiesen. Man erreicht dadurch eine Trennung in Proteinfractionen, welche sich durch das gemeinsame Merkmal auszeichnen, unter genau festgelegten physikochemischen Bedingungen, wie Feldstärke des angelegten Stromes, p_H und Ionenkonzentration des verwendeten Puffersystems, Temperatur und Versuchsdauer, eine bestimmte Wanderungsgeschwindigkeit zu besitzen. Die derart aufgetrennten Fraktionen werden somit durch eine elektrochemische Eigenschaft definiert, die noch keine Aussage über die chemische Einheitlichkeit bildet. So trennt die Elektrophorese das normale menschliche Blutserum in die Fraktionen Albumin, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globulin auf, obwohl auf chemischem Wege gegen 50 verschiedene Proteine aus dem Serum isoliert wurden. Für die Zwecke der genetischen Forschung wurde die Elektrophorese besonders interessant, als die modernen Papiermethoden es möglich machten, sehr kleine Proteinmengen quantitativ aufzutrennen. Während die klassische Elektrophorese nach Tiselius-Philpott-Svensson 5 cm³ einer 1%igen Proteinlösung benötigte, kommt die Papiermethode (PE) mit 2 mg Protein aus und erweist sich damit als eigentliche Mikromethode.

In der von uns entwickelten Elektrophorese-Apparatur werden zwei Filterpapierstreifen (Munktell Papier, Grycksbo, Schweden) von 7 × 40 cm quer in der Mitte leicht gefaltet und an der Faltstelle auf eine senkrecht stehende Glasplatte gelegt (s. Wunderly, Schneider, Hugentobler 1952). Die beiden Enden der Filterpapierstreifen ragen in die Küvetten mit Pufferlösung (Veronal-Na, $p_H = 8,8$, $\mu = 0,06$) und den Elektroden aus Platindraht. Um zu verhindern, daß Protein auf dem Papier antrocknet, stellt man die Apparatur unter eine Glocke aus Zelluloid. Für die Untersuchung der Hämolymphe wurde eine Spannung von 135 V und eine Stromstärke von 7–9 mA angelegt; die Elektrophoresedauer betrug 15 Stunden. Je nach Eiweißgehalt der Hämolymphe wurden an der Faltstelle des trockenen Papiers aus einer Mikropipette 0,06–0,09 cm³ davon in feinem Strich aufgebracht. Die Befeuchtung mit Pufferlösung geschieht sogleich anschließend. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Papierstreifen für 10 Min. bei 90° getrocknet; zur

Färbung legt man sie für 5 Min. in eine 1%ige methanolische Bromphenollösung, wobei die Lösung zur Fixierung des Eiweißes mit Sublimat gesättigt ist. Zur Entfärbung des überschüssigen Farbstoffes wird anschließend wechselweise in Methanol und Äthanol gebadet. Für die quantitative Auswertung der fertig gefärbten Papierstreifen schneidet man sie quer in Streifen von 5 mm Breite. Der Farbstoff in denselben wird mit soda-alkalischem 50%igem Methanol eluiert und die optische Dichte

im Beckman-Spektralphotometer auf der Wellenlänge $595\text{ m}\mu$ bestimmt. Anschließend werden die Meßwerte als Ordinaten aufgetragen und ergeben dann die Kurven, wie sie auf Abb. 1 abgebildet sind.

Zu den elektrophoretischen Ergebnissen mit Hämolymphe ist zu sagen, daß allgemein bei p_H 8,8 eine Aufteilung in zwei Proteinkomponenten eintritt; wir haben sie mit A und B bezeichnet, wobei A die größere Wanderungsgeschwindigkeit aufweist; verglichen mit derjenigen menschlicher Serumproteine, wandert A mit einer Geschwindigkeit, welche zwischen jener von α_1 - und α_2 -Globulin liegt, während B etwa β -Globulin entspricht. Somit wird keine Komponente sichtbar, die sich analog verhält wie Serumalbumin; und ebenfalls kein Protein, das seinen isoelektrischen Punkt auf der alkalischen Seite von p_H 8,8 besitzt. Bei *D. melanogaster* normal ist das Verhältnis der Proteinkomponenten A zu B wie 1,25 zu 1; bei der Mutante ltr dagegen 1,40 zu 1. In

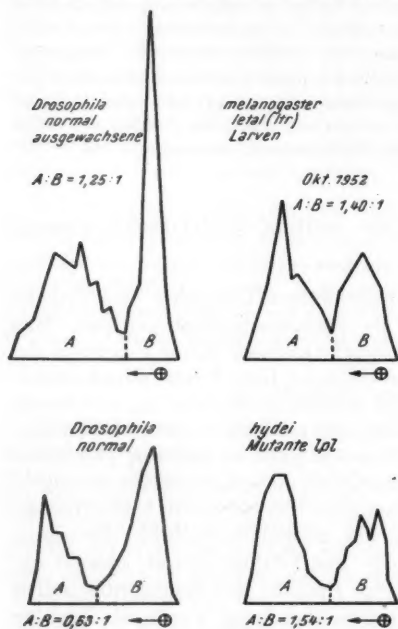


Abb. 1. Elektrophorese-Diagramme der larvalen Blutproteine normaler und letaler Genotypen von *Drosophila melanogaster* und *Drosophila hydei*.

beiden Fällen erweist sich die Komponente A als heterogenes Protein, während B recht homogen erscheint. Obwohl uns die Materialmenge erlaubte, Doppelversuche auszuführen, wird es Sache einer breiteren Bearbeitung sein, die physiologische Schwankungsbreite sowie den Einfluß des Larvenstadiums auf die Zusammensetzung der Hämolymphe durch Reihenversuche festzulegen.

Bei *D. hydei* normal ist das Verhältnis der Proteinkomponenten wie 0,63 zu 1; bei der Mutante lpl wie 1,54 zu 1. Während normalerweise A das heterogenere Protein darstellt, ist es bei der Mutante lpl die Komponente B. Bei *D. hydei* ist somit die eiweißchemische Verschiedenheit von normaler Hämolymphe und jener der Mutante lpl besonders stark ausgeprägt. Es wurde auch versucht, Hämolymphe von jüngeren Larvenstadien zu gewinnen, jedoch war die Ergiebigkeit nicht ausreichend.

b) Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Für die Charakterisierung eines Proteins ist die Bestimmung seines isoelektrischen Punktes (IEP) von besonderer Wichtigkeit, denn an jenem p_H -Wert tragen die Proteinteilchen keinen Ladungsüberschuß, und demzufolge tritt keine Wanderung ein (vgl. Wuhrmann, Wunderly 1952). Durch geeignete Variation des p_H -Wertes der Pufferlösung, in welcher die Papier-Elektrophorese vorgenommen wird, läßt sich die Lage des IEP gut bestimmen. Auf Abb. 2 erkennt man aus den angefärbten Filterpapierstreifen, daß bei p_H 8,8 alles Protein der Hämolymphe von *D. hydei* normal sich auf der alkalischen Seite seines IEP befindet und somit entsprechend der negativen Aufladung zur Anode wandert. Auf dem folgenden Papierstreifen sieht man, wie die Wanderungsgeschwindigkeit sich bei p_H 7,2 bereits deutlich verlangsamt hat.

Beim Papierstreifen mit p_H 6,7 ist die Umkehr der Wanderungsrichtung zur Tatsache geworden; und bei p_H 6,2 wandert das Protein der Hämolymphe ebenso rasch kathodenwärts, wie es bei p_H 8,8 anodisch beweglich ist. Aus dem Versuch bei p_H 6,7 läßt sich folgern, daß die Komponente A ihren IEP etwa bei p_H 6,7 und die Komponente B etwa bei p_H 7,0 hat; somit liegen beide nicht weit vom Neutralpunkt entfernt und unterscheiden sich deutlich vom Serumalbumin, das seinen IEP bei p_H 4,4 hat. Eine weitere Präzisierung des Proteincharakters würde die quantitative Bestimmung der Aminosäurebausteine erbringen; jedoch müßte vorerst sauber von den gefärbten Reaktionsprodukten abgetrennt werden. Die letzteren geben sich auf dem Papierstreifen als dunkler Fleck zu erkennen, der genau mit dem Orte des Auftrages der Hämolymphe zusammenfällt (Startlinie). Diese gefärbten Reaktionsprodukte lassen im p_H -Bereich von 8,8 bis 6,2 keine Wanderung erkennen. Die Verbreiterung des Startstriches, wie es auf Fig. 3 oben gut sichtbar wird, ist die Folge von Diffusionsvorgängen.

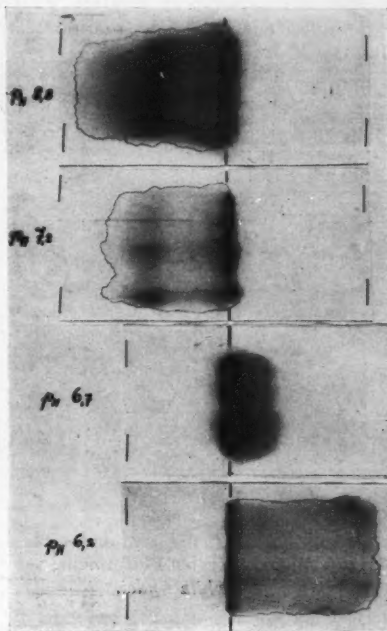


Abb. 2. Bestimmung des isoelektrischen Punktes der larvalen Blutproteine von *Drosophila hydei* mittels Papier-Elektrophorese im p_H -Bereich von 8,8 bis 6,2.

c) Charakterisierung der Koagulation

Nachdem die Koagulation der Hämolymphe im Gegensatz zu jener des Blutes sehr langsam verläuft, war die Möglichkeit gegeben, die Zeit- und

Temperaturabhängigkeit dieses Vorganges mit PE zu kennzeichnen. Zu diesem Zweck wurden je $0,06 \text{ cm}^3$ der frisch gewonnenen Hämolymphe von *D. hydei* normal auf einen Filterpapierstreifen gebracht und in feuchter Kammer bei 18° aufbewahrt. Nach 3, 6, 9 und 24 Std. wurden je ein Streifen der PE unterworfen. Die Papiere der Kolonne links auf Abb. 3 zeigen, wie mit der Zeit immer weniger Protein wandert und schließlich nach 24 Stunden überhaupt alles Protein an den Ort der Koagulation gebunden ist.

Um auf Lipide zu prüfen, wurde die obere Hälfte des 24-Stunden-Papierstreifens links unten während 24 Stunden mit der Bloorschen Mischung

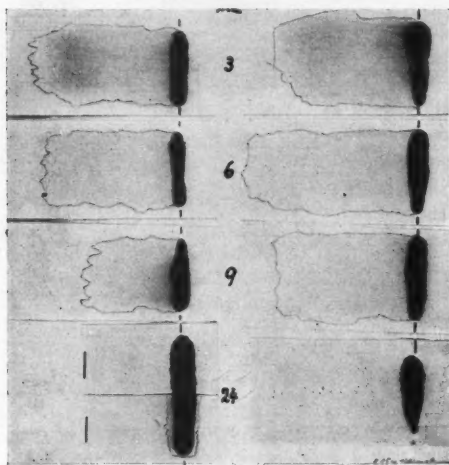


Abb. 3. Bestimmung des zeitlichen Ablaufes der Koagulation der larvalen Blutproteine von *Drosophila hydei*.

von 3 Teilen Äthanol und 1 Teil Äthyläther am Rückfluß extrahiert. Die nachfolgende Färbung läßt kaum einen Unterschied erkennen, so daß Lipoid nur in sehr kleinen Mengen vorhanden sein kann. Mittels kombinierter Färbung durch

Cibablau/Sudan-

schwarz auf Papier, wo viel Hämolymphe aufgetragen worden war, gelang der färberische Nachweis von Lipoid. Da es keine Wanderung zeigt, handelt es sich nicht um Lipoprotein oder Phospholipide, sondern eher um Neutralfett oder Fettsäureester. Die Kolonne rechts auf Fig. 3 zeigt analoge Versuche, wo der Hämolymphe jeweils 1 Tropfen Heparinlösung beigemischt worden war.

Eine Hemmung des Koagulationsablaufes ist indessen nicht eingetreten, so daß die Beteiligung von Thrombin ausgeschlossen werden kann. Ebenso hatte Monochloressigsäure keine sichtbare Wirkung auf den Gerinnungsablauf. Derselbe ist somit abhängig von der elektrischen Ladung und dem Grade der Solvatation der Ionen, welche sich an der Oberfläche der Kolloidteilchen befinden. Dieser Änderung der kolloid-chemischen Gegebenheiten überlagert sich die Autoxydation ungesättigter Verbindungen.

Es ist bekannt, daß für viele chemische Reaktionen eine Erhöhung der Temperatur um 10° eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit herbeiführt. Sowie jedoch Makromoleküle wie die Proteine an der Reaktion teilhaben, ist die Temperaturabhängigkeit oft gerade umgekehrt. So verläuft die Denaturation von Ovalbumin durch Urea in der Wärme langsamer; während Fermentreaktionen im allgemeinen durch Wärme begünstigt werden, bis zu jener Temperatur, wo die Hitzestabilität des Enzym-

systems aufhört. Um die Temperaturabhängigkeit der Koagulation der Hämolymphe von *Dros. mel.* normal und letal-Mutante ltr zu charakterisieren, haben wir auf je einen Filterpapierstreifen 0,08 cm³ davon in dünnem Strich aus Mikropipette aufgebracht. Die Papierstreifen wurden in feuchte Kammern gebracht und dort bei 38°/18°/2° während 15 Stunden verwahrt. Nach dieser Zeit wurde in üblicher Weise die Papier-Elektrophorese vorgenommen. Das Ergebnis der mit Bromphenolblau gefärbten Streifen geht aus Abb. 4 hervor.

Der Vergleich zeigt, wie die höhere Temperatur die Koagulation begünstigt und dadurch mehr Protein gebunden wird. Um dies näherungsweise zahlenmäßig zu belegen, haben wir die vom gewanderten Protein bedeckten Flächen planimetriert. Sie verhalten sich bei 38°/18°/2° für *D. melanogaster* normal wie 5,5/7,2/20,1 und bei der ltr-Mutante wie 5,5/7,8/12,0. Da der Proteingehalt der Hämolymphe der Mutante kleiner ist, so sind die Zahlenverhältnisse nicht in quantitativem Sinne vergleichbar; dagegen kann man schließen, daß die Temperaturerhöhung von 2° auf 18° den größeren Einfluß auf die Koagulation ausübt als jene von 18° auf 38°. Wie nicht anders zu erwarten war, verläuft die Koagulation als endothermer Vorgang. Es erscheint als nicht ausgeschlossen, daß solche Überlegungen eine praktische Verwertung finden für die Zwecke der Züchtung und der Operationstechnik (Transplantation). Beard (1950), welcher die Koagulation der Hämolymphe von *Popillia japonica* und von *Galleria melonella* untersuchte, fand keine spezifischen Wirkungen von oxydierenden und reduzierenden Substanzen; ebensowenig von Hirudin, Heparin, Zitraten, Oxalaten, Dicumarol und Calciumcyanid. Versuche mit Phosphatpuffern ergaben, daß die Gerinnung zwischen p_H 5 und p_H 8 erfolgt und durch oberflächenaktive Stoffe gehemmt werden kann.

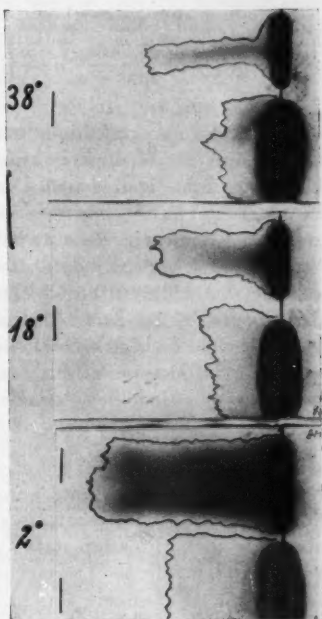


Abb. 4. Temperaturabhängigkeit der Koagulation der Hämolymphe von *Drosophila melan.* normal (auf den Papierstreifen das obere Diagramm) und der Mutante ltr (auf den Papierstreifen das untere Diagramm).

Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, näheren Aufschluß über die Auswirkungen der Letalfaktoren ltr von *D. melanogaster* und lpl von *D. hydei* zu erhalten. Von allgemeinen Gesichtspunkten, die in Untersuchungen über die

Wirkungsweise von Genen zu berücksichtigen sind, sollen die folgenden kurz hervorgehoben werden:

1. Aus biochemischen und genetischen Arbeiten, hauptsächlich am Mikroorganismus, geht hervor, daß Gene Schlüsselstellungen im biochemischen Gefüge der Organismen einnehmen. Durch die Mutation eines Gens kann der Stoffwechsel so geändert werden, daß quantitative und qualitative biochemische Unterschiede entstehen. Es scheint, daß diese Unterschiede häufig auf Verlust oder Inaktivierung eines bestimmten Fermentes zurückgeführt werden können (Beadle 1945).

2. Das augenfällige Resultat einer Genänderung bei höheren Organismen sind die mannigfaltigen morphologischen Auswirkungen, die in ihrem Endergebnis als Wirkungsmuster oder, wo es sich um Letalfaktoren handelt, als letales Schädigungsmuster erfaßt werden können (Hadorn 1945). Die Genwirkung kann selbstverständlich nur verstanden werden bei gleichzeitigem Einblick in die entwicklungsphysiologischen Zusammenhänge. Eine Schwierigkeit besteht jedoch darin, daß die für genetische Untersuchungen geeignetsten Objekte entwicklungsphysiologisch wenig bekannt sind und daß außerdem die entwicklungsphysiologische Analyse in keinem Fall so weit gediehen ist, daß eine Definition biochemischer Veränderungen möglich wäre, die der Determination, Segregation und Differenzierung vor Organen, Geweben und einzelnen Zellen zugrunde liegen.

3. Eine offensichtliche oder versteckte Pleiotropie ist in der Regel charakteristisch für Mutationen höherer Organismen. Die Grundlage einer solchen Spezifität der Genwirkung könnte darin liegen, daß eine bestimmte Veränderung des Stoffwechsels zwar sämtliche Zellen des Organismus erfaßt, aber nur in bestimmten dafür sensiblen Zellen eine bleibende Änderung zur Folge hat, die als Abweichung von der Norm sichtbar wird. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die Aktivierung eines Gens von Anfang an beschränkt ist auf bestimmte Gewebe oder Differenzierungszustände von solchen. Die reich differenzierten Schädigungsmuster bestimmter spätwirkender Letalfaktoren von *Drosophila* bieten günstige Voraussetzungen für eine entwicklungsphysiologische Analyse der betreffenden Genwirkung (Hadorn 1948).

Es ist deshalb naheliegend, zu untersuchen, ob bei solchen Letalfaktoren mit eindrucklichen morphogenetischen Effekten qualitative oder quantitative chemische Veränderungen nachgewiesen werden können, entsprechend den sogenannten biochemischen Mutationen bei morphogenetisch weniger differenzierten Organismen und Einzellern. Änderungen im biochemischen Gefüge sind hier um so mehr zu erwarten, als schon zwei ganz zufällig ausgewählte, die Vitalität kaum beeinträchtigende Augenfarbmутanten (*rb* und *v* von *D. melanogaster*) in einem bzw. in zwei Antigenen vom Wildtyp verschieden sind, d. h. wahrscheinlich qualitativ verschiedene Proteine enthalten (Fox 1948). Entsprechendes wurde von Caspari und Dalton (1949) für die Mutanten *T* (Kurzschwänzigkeit) bei der Hausmaus und *a* (helle Augenfarbe) bei *Ephestia kühniella* gefunden. Bei *Ephestia* scheint

zum mindesten einer der beteiligten Stoffe in Protein der Globulinfraktion zu sein. Schon frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß das Gen *a* von *Ephestia* die Umwandlung von Tryptophan verhindert, was zu einer Anhäufung dieses Stoffes führt, der, wenn nicht vollständig, so doch größtenteils in Proteinen enthalten ist (Caspari 1946). Eine qualitative Verschiedenheit der Proteine äußert sich auch darin, daß Proteine der *a*-Mutante widerstandsfähiger sind gegen autolytische Fermente als die Proteine des Wildtypus (Caspari und Richards 1948). Daß im vorliegenden Falle die Unterschiede tatsächlich einer Wirkung der betreffenden Letalfaktoren zuzuschreiben sind, ist zwar nicht bewiesen, aber mindestens wahrscheinlich. Vor allem könnte der Einwand erhoben werden, daß die zum Vergleich verwendeten Entwicklungsstadien normaler und letaler Larven in ihrem physiologischen Entwicklungszustand verschieden sein könnten und daß die gefundenen Unterschiede möglicherweise einer Differenz im Entwicklungszustand zuzuschreiben wären. Da dieser Einwand nur durch mühsame Serienuntersuchungen verschiedener Entwicklungsstadien widerlegt werden könnte, mußte auf eine solche Kontrolle verzichtet werden.

Die elektrophoretische Prüfung hat für die Blutproteine zwar keine Unterschiede aufgezeigt, die eindeutig auf eine Entstehung qualitativ verschiedener Proteine unter dem Einfluß von Letalfaktoren hindeuten würden, wohl aber quantitative Abweichungen vom Wildtyp. Dies gilt vor allem für die *lpl*-Mutante von *D. hydei*, wo das Mengenverhältnis der Proteine A und B sehr stark verschoben ist. Dagegen ist die Abweichung bei *ltr* von *D. melanogaster* gering. Es können deshalb die Proteine A und B nicht mit den durch Koagulation trennbaren Fraktionen (Gloor 1949) in Beziehung gebracht werden. Vergleicht man *D. melanogaster* mit *D. hydei*, so findet man auf Grund der elektrophoretischen Charakterisierung eine ziemlich übereinstimmende Proteinzusammensetzung. Deren Mengenverhältnisse sind zwar verschieden, doch ergibt sich der bemerkenswerte Befund, daß noch größere Abweichungen innerhalb einer Art (*hydei*) durch einen Letalfaktor verursacht werden können.

Zusammenfassung

Die Papier-Elektrophorese der larvalen Blutproteine von normalen und letalen Genotypen von *Drosophila melanogaster* und *Drosophila hydei* läßt stets zwei verschieden rasch wandernde Proteinfractionen erkennen; diese zeigen bei der quantitativen Auswertung beträchtliche Unterschiede. Der isoelektrische Punkt der beiden Fraktionen liegt bei p_H 6,7 und bei p_H 7,0.

Um die Koagulation der Hämolymphe *in vitro* zu charakterisieren, wird deren Zeit- und Temperaturabhängigkeit gemessen. Im beobachteten Temperaturintervall von 2 bis 38°C verläuft die Koagulation endotherm; sie bleibt unbeeinflusst durch Zusätze von Heparin und Monochloressigsäure.

Wir verdanken die Mitarbeit von Frau Dr. E. Gloor und Frä. Dr. Brunnold sowie die technische Mithilfe von Frä. R. Salzmann.

Literatur

- Beard, L., 1950: *Physiol. Zool. (Am.)* 23, 47—57.
- Beadle, E., 1945: *Biochemical Genetics. Chem. Rev.* 37, 15—96.
- Bloor, W. R., 1943: *Biochemistry of the Fatty Acids* (New York 1943).
- Caspari, E., 1946: On the effects of the gene *a* on the chemical composition of *Ephestia kühniella* Zeller. *Genetius* 31, 454. 474.
- and J. Richards, 1948: On the proteins of *a⁺ a⁺* and *aa* *Ephestia*. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 34, 587—594.
- and H. C. Dalton, 1949: Genic action. *Yearb. Carnegie Inst. of Washington* 48, 188—201.
- Fox, A. S., 1948: Antigenic effects of certain single gene mutations in *Drosophila melanogaster*. (Abstract) *Genetics* 33, 610.
- Gloor, H., 1949: Biochemische Untersuchungen am Letalfaktor „letal translucida“ von *Drosophila melanogaster*. *Rev. suisse de Zool.* 56, 281—285.
- Hadorn, E., 1945: Zur Pleiotropie der Genwirkung. *Arch. Klaus-Stiftg. Ergänzungsband zu Bd. 20*, 82—95.
- 1948: Gene action in growth and differentiation of lethal mutants of *Drosophila*. *Symp. Soc. Exper. Biol. 11 Growth*, 177—195.
- 1949: Zur Entwicklungsphysiologie der Mutante „letal-translucida“ (*ltr*) von *Drosophila melanogaster*. *Rev. suisse de Zool.* 56, 271—280.
- and H. K. Mitchell, 1951: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paper chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 37, 650—665.
- Rosin, S., 1949: Lokalisation des Faktors „letal-translucida“ (*ltr*) von *Drosophila melanogaster*. *Rev. suisse de Zool.* 56, 338—343.
- Staiger, H., und H. Gloor, 1952: Mitosehemmung und Polyploidie durch einen Letalfaktor (*lpl* = letal-polyploid) bei *Drosophila hydei*. *Chromosoma* 5.
- Wunderly, Ch., G. Schneider und F. Hugentobler: Papier-Elektrophorese, *Compt. rend. 111 Congr. d'Hémat.* 240 (1952).
- Wuhrmann, F., und Ch. Wunderly: Die Bluteiweißkörper des Menschen. 82/83 (Basel 1952).

Eiweißpolyeder in *Pereskioipsis*-Virusträgern

Von

Friedl Weber

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 24. Dezember 1952)

Daß Parakristalle von Eiweiß in Kakteen vorkommen, wenn diese Virusträger sind, darüber wurde schon berichtet (Weber und Kenda 1952, Weber, Kenda, Thaler 1952). Die Form dieser Gebilde kann sehr verschieden sein, ihr Bau ist im allgemeinen faserig, Küster (1951: 437) bezeichnet daher die „Eiweißspindeln“, die schon lange bekannt waren, bevor man ihr Auftreten als die Folge einer Virus-Infektion betrachtete, als „Eiweißfibrillenbündel“. Über das Vorkommen polyedrischer Eiweißkristalle in Kakteen-Virusträgern war bisher nichts bekannt.

In den Blättern von *Pereskioipsis pititache* haben Weber, Kenda, Thaler (1953) große granuläre cytoplasmatische Einschlusskörper hauptsächlich in den Epidermiszellen gefunden. Diese X-bodies neigen zur Kristallbildung, und es entstehen dabei mehr oder weniger zahlreiche kleine, nadelförmige Parakristalle, die sich auch zu größeren Eiweißspindeln vereinigen können. In alternden Blättern, zu Beginn der Vergilbung, können in den X-Körpern Vakuolen auftreten, und häufig bilden sich dabei in einem X-Körper in Ein- oder Mehrzahl Kristalle von nicht spindeliger Gestalt (Abb. 1 und 2). Diese polyedrischen Körper, die sich in den Vakuolen der cytoplasmatischen Einschlusskörper befinden, sind in vivo gut zu sehen, sie erfüllen in der Regel den Vakuolenraum nicht ganz, so daß zwischen der deutlich sichtbaren Vakuolenhaut und dem Polyeder ein optisch leerer Raum liegt. Diese Polyeder, deren Größe je nach der Größe der X-body-Vakuolen verschieden ist, sind doppelbrechend, sie geben die Miltonsche Reaktion und nehmen in Jodjodkali braune Färbung an. Es darf vermutet werden, daß es sich um Eiweißkristalle handelt.

„Hexagonale Viruskristalle“ hat Kausche (1939) für Haarzellen mosaikranker Tabakblätter beschrieben und abgebildet. Gleich aussehende Kristalle fanden sich in den Blattepidermis-Zellen von *Pereskioipsis pititache*, und zwar außerhalb des X-Körpers. Es war zunächst naheliegend, auch diese Kristalle für Virus-Eiweißkristalle zu halten. Diese außerhalb des Einschlusskörpers liegenden Kristalle (Abb. 3) geben aber keine Eiweiß-

reaktionen und sind viel stärker doppelbrechend als die Eiweißkristalle innerhalb des Einschlusskörpers. Da die „hexagonalen Kristalle“ selten auf-

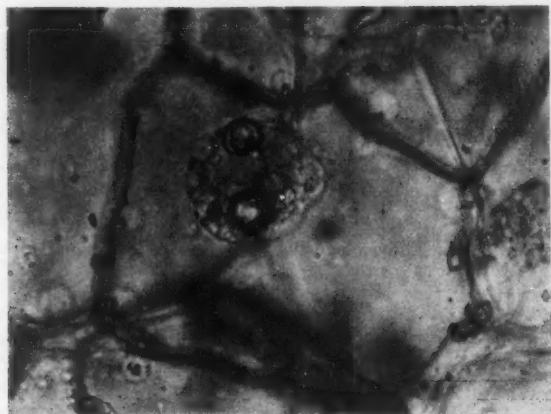


Abb. 1. Blatt-Epidermiszelle von *Pereskia pitiata*. In zwei Vakuolen des cytoplasmatischen Einschlusskörpers je ein Eiweißpolyeder.

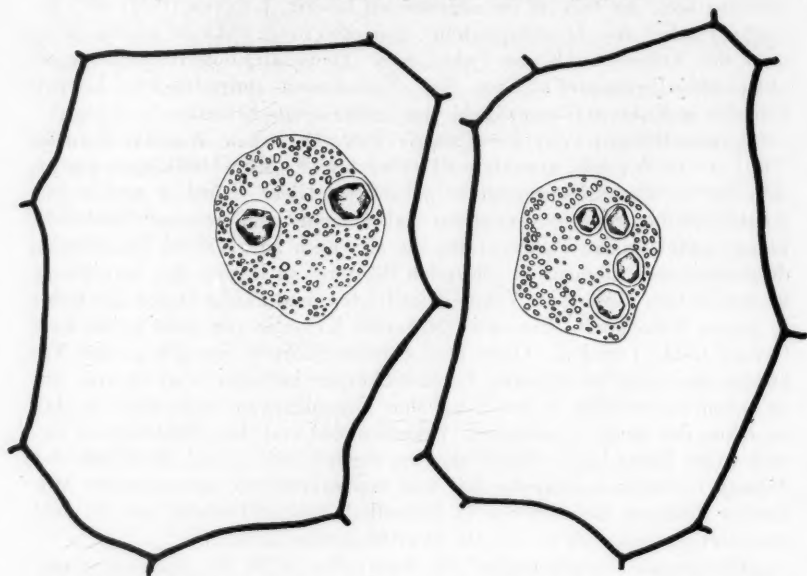


Abb. 2. Blatt-Epidermiszellen von *Pereskia pitiata*. Cytoplasmatische Einschlusskörper mit Eiweißpolyedern.

treten, so konnten an ihnen nicht genügend Reaktionen ausgeführt werden, um ihre Natur aufzuklären.

Die Exemplare von *Pereskia pititache*, die vom Institut für systematische Botanik der Universität Graz in entgegenkommender Weise zur



Abb. 3. Blatt-Epidermiszelle von *Pereskia pititache*. Ein „Hexagonaler Kristall“ nicht-eiweißartiger Natur.

Untersuchung zur Verfügung gestellt wurden, weisen alle in den Epidermiszellen der Blätter cytoplasmatische Einschlusskörper auf. Es darf angenommen werden, daß alle diese Pflanzen Virusträger sind. Virusfreie Exemplare standen nicht zur Verfügung. Es kann daher nicht gesagt werden, ob die hexagonalen Kristalle, die außerhalb der Einschlusskörper auftreten, auch in virusfreien Pflanzen zu finden sind.

Andererseits kann es kaum fraglich sein, daß die Pflanzen, die die typischen cytoplasmatischen Einschlusskörper zeigen, auch wirklich viruskrank sind. Über viruskranke Kakteen haben schon 1932 Pape sowie Blattny und Vukolov berichtet. Ich wurde auf diese Arbeiten eben erst durch Herrn Dr. H. A. Uschdraweit (Biologische Zentralanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem) in dankenswerter Weise aufmerksam gemacht. Die genannten Autoren haben Symptome der Mosaikkrankheit bei den von ihnen untersuchten Kakteen



Abb. 4. Viruskranke *Pereskia pititache*. Sproßspitze gekrümmt.

festgestellt. Solche Symptome sind an den mir zur Verfügung stehenden Exemplaren von *Pereskiopsis pitiata* derzeit nicht zu sehen. Dagegen fällt es auf, daß bei zwei Pflanzen die Sproßspitze eine Krümmung aufweist (Abb. 4), für die eine äußerliche Ursache (etwa einseitige Beleuchtung) nicht ersichtlich ist. Verbiegungen der Sprosse kommen bei verschiedenen Viruskrankheiten vor: Kunkel (1944) bildet das „bending of stems caused by the disease“ für an Virose leidende Tabak- und Spinatpflanzen ab.

Zusammenfassung

In den Epidermiszellen der Blätter von *Pereskiopsis pitiata* finden sich cytoplasmatische Einschlusskörper mit Vakuolen. In den Vakuolen können Eiweißpolyeder auftreten. Abgesehen von diesen mikroskopisch erkennbaren Anzeichen einer Viruskrankheit zeigen diese Pflanzen als äußerlich sichtbares Symptom einer Virose Krümmung der Sproßspitze.

Literatur

- Blattny und Vukolov, 1932: Mosaik bei *Epiphyllum truncatum*. Gartenbauwissenschaften 6.
- Kausche, 1939: Über die Bildung von hexagonalen Viruskristallen. Naturwissenschaften 27, 77.
- Kunkel, 1944: General Pathology of Virus Infections in Plants. In Doerr und Hallauer: Handbuch der Virusforschung, 1. Ergänzungsband. Wien.
- Küster, 1951: Die Pflanzenzelle. 2. Aufl. Jena.
- Pape, 1932: Mosaikkrankheit an Glieder-, Blatt- und Rutenkakteen. Gartenwelt 36.
- Weber und Kenda, 1952: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln. Protoplasma 41.
- 1952: Die Viruskörper von *Opuntia subulata*. Protoplasma 41.
- , Kenda, Thaler, 1952: Viruskörper in Kakteen-Zellen. Protoplasma 41.
- — — 1953: Eiweißspindeln und cytoplasmatische Einschlusskörper in *Pereskiopsis*. Protoplasma 41.

Die Grana-Anordnung in Chloroplasten

Von

W. Mevius sen. und D. Düvel

Aus dem Staatsinstitut für allgemeine Botanik, Hamburg

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 2. Februar 1953)

Die wechselvolle Geschichte der Theorien über den Aufbau der für das Leben auf der Erde wichtigen Chloroplasten läßt die Schwierigkeiten durchblicken, die schon im bloßen Erkennen der Granen liegen. Über Lage und Anordnung dieser an der Grenze des Auflösungsvermögens der Lichtmikroskope liegenden Körperchen bestehen verständlicherweise die verschiedensten Ansichten, von denen nur einige hier erwähnt werden sollen.

Heitz (1936a, b), der die von A. Meyer (1883) und A. F. Schimper (1885) aufgestellte Granalehre klar beweisen konnte, beschreibt die Grana als chlorophyllhaltige Scheiben, die im farblosen Stroma des Chloroplasten verteilt sind. Rezende-Pinto (1952) vertritt die Ansicht, daß die den Blattfarbstoff tragenden Grana rosenkranzartig an einem fadenartigen Chloroplastonema aufgereiht sind und in Spiralform lediglich die Oberfläche der Chloroplasten umwinden. Nach Strugger (1951) liegen die Grana genau senkrecht geldrollenförmig untereinander. Vor Strugger hat Menke (1940) in einer schematischen Zeichnung diese säulenartige, geschichtete Anordnung gewählt, ohne sie jedoch im Text näher zu erwähnen.

Die an verschiedenen Pflanzen (*Aspidistra elatior*, *Dracaena deremensis*, *Impatiens parviflora* u. a.) durchgeführten eigenen Chloroplastenuntersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse.

Die subjektiven Beobachtungen hatten gezeigt, daß bei wechselnder Höheneinstellung des Mikroskoptubus die Grana der in Aufsicht liegenden Chloroplasten nicht genau unter- bzw. übereinander lagen, sondern daß tiefer im Stroma liegende Grana im Vergleich zu höher liegenden seitlich versetzt waren, d. h. daß sie ihre Lage innerhalb einer zum Mikroskoptisch parallelen Ebene verändert hatten. Die Richtung der seitlichen Verlagerung war dabei nicht einheitlich, was dann vielleicht durch Wanderung etwaiger Beckescher Linien, durch Beugungserscheinungen oder sonstige rein optische Effekte hätte erklärt werden können. Die Beobachtungen konnten durch photographische Aufnahmen bestätigt werden. Der photographische Nachweis einer Ortsänderung der Granen erfordert eine Anzahl nicht ver-

änderlicher fester Bezugspunkte, die in der Aufnahme mit erscheinen. Das Einfügen einer festen Marke, dies konnte z. B. ein regulärer, unlöslicher

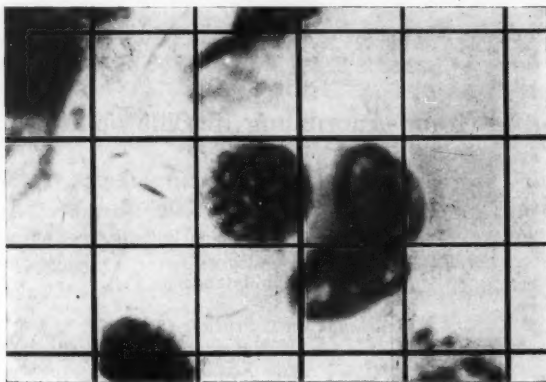


Abb. 1. Lebender Chloroplast von *Impatiens parviflora* in Flächenansicht. Gitterabstand entspricht $5,5 \mu$.

Kristall sein, in das Objekt selbst war ohne Schädigung der Chloroplasten bisher nicht möglich. So wurden Okularnetzmikrometer zu festen Bezugssystemen gewählt. Bei den Aufnahmen wurde wie folgt vorgegangen: Ein

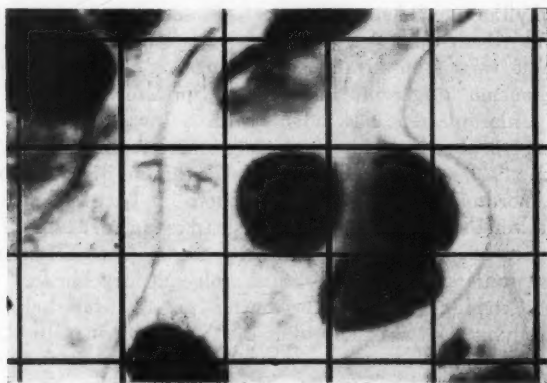


Abb. 2. Derselbe Chloroplast wie auf Abb. 1 bei tieferer Tubuseinstellung.

durch einige Tage Abdunkeln stärkefrei gemachter Chloroplast, dessen größte Ausdehnung senkrecht zur Mikroskopachse lag, wurde in die Mitte des Blickfeldes gebracht. Bei der obersten Scharfeinstellung wurden Chloroplast und Netzmikrometer photographiert. Dann wurde der Mikroskop-tubus um $0,3-0,4 \mu$ heruntergedreht. Nach der Senkung wurde erneut eine

Aufnahme gemacht und nach der nächsten Senkung wieder eine. Die Aufnahmen trafen also optische Schnitte, die einen Höhenunterschied von 0,5

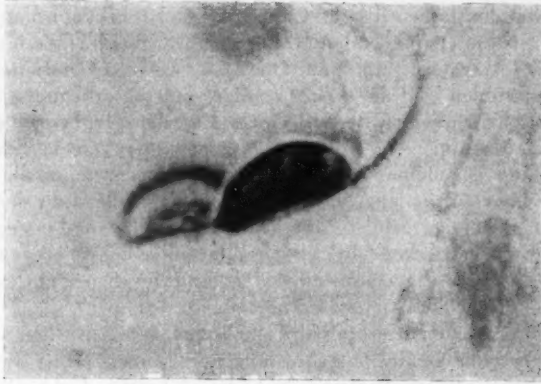


Abb. 3. Stärkefreier Chloroplast in Profilstellung.

bis $0,4 \mu$ hatten. Zwischen den Aufnahmen verstrichen nicht mehr als 5 sec. Das Photomaterial wurde dann gleichmäßig behandelt und vergrößert. Eine eventuelle Verzerrung der Negative oder Positive wurde durch Abstandsmessungen mehrerer Fixpunkte kontrolliert. Die Ausmessungen der Granen in ihrer Lage zum mitphotographierten Netz erfolgte mit einer Gitterplatte, deren Strichabstand 1 mm betrug und deren Koordinatennullpunkt ein bestimmtes Fadenkreuz war. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen zwei auf diese Weise erhaltene optische Schnitte durch einen Chloroplasten einer lebenden Schwammparenchymzelle von *Impatiens parviflora*. Der Schnitt auf Abb. 1 liegt ungefähr $400 m\mu$ höher als der auf Abb. 2, der eine Region unterhalb der Mitte des Chloroplasten getroffen hat. Beim Vergleich dieser beiden Bilder erkennt man die unterschiedliche Lage der jeweils scharf erscheinenden Granen. Dies wird scharf erscheinenden Granen. Dies wird durch eine Ortsbestimmung der Granen mit Hilfe des Koordinatensystems der Gitterplatte bestätigt und ebenso durch ein Aufeinanderlegen transparenter Bilder.

Die Beobachtung von Chloroplasten in Profilstellung brachte weitere Aufklärung über die Granaverteilung. Die Granascheibchen lagen leicht

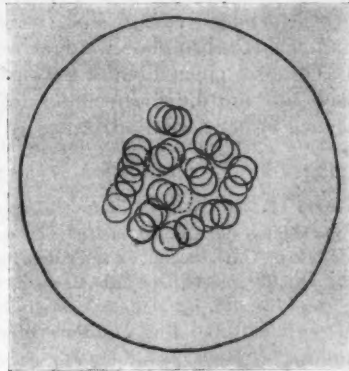


Abb. 4. Schema der Granaanordnung eines Chloroplasten in Aufsicht.

seitlich versetzt übereinander, so daß sie schräg stehende Säulen zu bilden schienen, die sich nach verschiedenen Richtungen neigten. Abb. 3 zeigt einen lebenden Chloroplasten in Seitenlage, der einer Zellwand anliegt. Im rechten Drittel des deutlich sichtbaren Chlorophyllkorns erkennt man eben noch die hier als Striche erscheinenden Grana in Seitenansicht. Weiter zur Mitte hin wird die Lagerung kompakter. Die nach verschiedenen Seiten sich neigenden Granasäulen sind mehr oder weniger klar zu erkennen.

Abb. 4 zeigt die aus den Beobachtungen und den photographischen Aufnahmen und Messungen zu folgernde Granalage in einem Schema. Die Scheibchen sind gegeneinander versetzt angeordnet, wie es die einzelnen Münzen in einer schräg zur Seite geneigten Geldrolle auch sein können. Diese schief stehenden Säulen scheinen sich oft bis in die gegenseitigen toten Räume zu erstrecken. In diesem Bild soll ein ausgezogener kleiner Kreis ein Granum in der Zeichenebene, ein unterbrochener ein tieferes und ein gestrichelter ein noch tiefer liegendes darstellen.

Diese Chloroplastenstruktur würde zwischen den Ansichten von Heitz (1936a, b), der über Geldrollenanordnung der Granen nichts aussagt, und Strugger (1951) stehen, der immer nur die senkrechte Geldrollenform gefunden hat. Auch Rezende-Pinto (Abb. 2, 1952) ordnet in seinem Schema eines Chloroplasten in Seitenansicht die Grana nicht senkrecht übereinander, aber seine Deutungen und Erklärungen sind ja grundsätzlich andere.

Die Arbeitshypothese, daß die Grana eine durch intergranuläre Lamellen oder durch andere Strukturelemente ermöglichte Lageveränderlichkeit besitzen, daß sie also einmal senkrecht untereinander, ein andermal schräg gegeneinander versetzt sind, wäre mit der Aufgabe dieser chlorophyllhaltigen Scheiben ohne weiteres vereinbar. Versuche, ob wechselnde Lichtverhältnisse einen Einfluß haben auf die Granaverteilung, also praktisch auch auf die die Lichtenergie auffangende Gesamtfläche der Grana, erlauben bisher noch nicht, Aussagen zu machen.

Literatur

- Heitz, E., 1936a: Gerichtete Chlorophyllscheiben als strukturelle Assimilationseinheiten der Chloroplasten. *Ber. d. Dtsch. Bot. Ges.* 54, 362.
 — 1936b: Untersuchungen über den Bau der Plastiden. *Planta* 26, 134.
 Menke, W., 1940: Die Lamellenstruktur der Chloroplasten im UV-Licht. *Naturwiss.* 28, 158.
 Meyer, A., 1885: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig.
 Rezende-Pinto, M. C., de 1952: Über die Genese und Struktur der Chloroplasten bei den höheren Pflanzen. *Protoplasma* 41, 33.
 Schimper, A. F., 1885: Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 16, 11.
 Strugger, S., 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 64, 69.

Doppelbrechung und Orientierungsrate der Leptonen fließenden Protoplasmas

Von

Hans H. Pfeiffer

Aus dem Laboratorium für Polarisations-Mikroskopie, Bremen

Mit 2 Textabbildungen

(Eingelangt am 20. Oktober 1952)

Meinen „capillary birefringent effect of flow“ des Protoplasmas [7 a—c, e, 8, 7 g, k] habe ich in der Weise zu deuten versucht, daß ich die beim Fließen des Protoplasmas durch Capillaren auftretende Anisotropie (Doppelbrechung und Beugungspolarisation; s. [7 f]) auf die dabei hervorgerufene Orientierung der protoplasmatischen Leptonen zurückgeführt habe. Erfahrungen mit variierenden Intensitäten der Anisotropie haben diese Annahme eigentlich schon immer gestützt, bedürfen aber vielleicht einer quantitativen Bestätigung durch Bestimmung der Abhängigkeit der Anisotropie von der Fließgeschwindigkeit bzw. dem Verstreckungsgrade des Materials. Mit der bis soweit geübten Technik [7 e] kommt man hierbei aber nicht aus, vielmehr muß das Protoplasma in den einzelnen Versuchsserien in quantitativ festgelegten Geschwindigkeiten zum Fließen gebracht werden. Über Versuchsanordnung und Resultate solcher Untersuchungen sei hier jetzt kurz berichtet.

Material und Apparatur. — Zur Beschaffung des Versuchsmaterials sind nach der Methode von Küster (1910) nackte Protoplasten (Gymnoplasten) vor allem aus Zellen der Zwiebel-schuppenepidermen von *Tulipa* isoliert und zur Fusion gebracht worden [1, 5, 4 a—b, 7 d]. Nur wenn es gelingt, eine vollkommene Fusion der Gymnoplasten, nicht nur ihre Verklebung an der Kontaktfläche, zu erreichen und sie zu einem gemeinsamen Tropfen zusammenfließen zu lassen, kann das Material zu den Fließversuchen benutzt werden.

Um einen quantitativ definierbaren Streckungsgrad des Materials durch eine festgelegte Fließgeschwindigkeit zu gewährleisten, ist ein Verfahren von Gerendás [3] angewandt worden, welches dieser zur Herstellung gleichmäßig beschaffener Myosinfäden unter Benutzung einer eigens konstruierten Apparatur (Abb. 1) eingeführt hat.

Auf ein Tischchen, welches durch einen kleinen Elektromotor *E* mit veränderlicher Geschwindigkeit gedreht werden kann, wird eine Petrischale *P* mit einer verdünnten Salzlösung gebracht, in welche aus einer Auslaufcapillare *C*, die mit einem kleinen Reservoir *R* verbunden ist, das Material der zusammengefloßenen Gymnoplasten ausgepreßt wird. Der dazu erforderliche Druck über dem Versuchsmaterial wird mittels einer kleinen Gummipumpe *B'* hervorgerufen, mittels eingeschalteten Gummiballs *B''* stabilisiert und an zwischengeschaltetem Manometer *M* gemessen; auch kann der Druck nach Bedarf durch einen seitlich angebrachten Quetschhahn *S* aufgehoben werden. Die Ausflußapparatur (Capillare mit Reservoir) ist verschiebbar an einem Tragbalken montiert. Erst wenn die — zur Gelbildung benutzte — Flüssigkeit in der Petrischale durch die Tätigkeit des

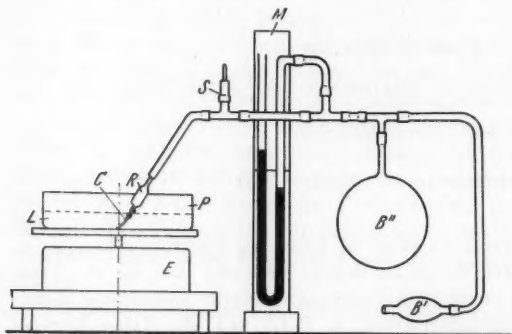


Abb. 1. Versuchsanordnung nach der Apparatur von Gerendás [3]; s. die Textausführungen.

Motors als Ganzes zum Fließen gekommen ist, darf durch Aufsetzen des Druckes in der Apparatur das Protoplasma-material in der Ausflußrichtung ausgespritzt werden.

Die Intensität der Doppelbrechung ist mittels kompensatorischer Messung mit $\lambda/30$ -Glimmerplättchen bestimmt worden [7 i]. Die ermittelten Werte sind nicht in Abhängigkeit vom prozentualen Streckungs-

grade selbst verglichen worden, weil sich dieser auf die gesamte Länge beziehen muß, bei der angewandten Technik sich die Verstreckung aber — insbesondere bei niedrigen Verstreckungsgraden — unregelmäßig über die Länge verteilt. Indem dabei Stellen verschiedener Dicke miteinander wechseln, kann die gemessene Verlängerung kein geeignetes Maß für die Verstreckung an einer gerade beobachteten Stelle des Versuchsfadens sein. Aber auch die statt dessen mittels Okularmikrometers bestimmten Dicken (Durchmesser) der Fäden zeigen, vielleicht hauptsächlich wegen der Genauigkeitsgrenze der Messungsapparatur, eine beträchtliche Streubreite. So ist denn die Doppelbrechung in Abhängigkeit von der Abzugsgeschwindigkeit beim Ausfließen des Protoplasmas aus der Capillare bestimmt worden; die Werte der Abzugsgeschwindigkeit ergeben sich mit großer Genauigkeit direkt aus der Geschwindigkeit der Bewegung der Petrischale auf dem Tischchen durch den Elektromotor.

Ergebnisse und Diskussion. — Durch den Versuch werden aus den zusammengefloßenen Tropfen der Gymnoplasten Fäden gezogen, welche selbstverständlich nicht mehr als lebend angesehen werden können. Da das Material kaum noch Vakuolen enthält, kann es auch in hypertotonischen Medien nicht eigentlich zum Plasmolysieren gebracht werden, sondern nur eine Plasmorrhise i. S. von E. G. Balbiani erfahren. Bei

längerem Aufenthalt in Wasser oder hypotonischen wäßrigen Lösungen beginnen die ausgezogenen Protoplasmafäden zu quellen, doch kann diese Veränderung durch Neutralsalze in starker Verdünnung, etwa durch 0,002 mol KCl, meist erfolgreich gehemmt werden. Andererseits empfiehlt es sich, die für den Versuch zu benutzenden fusionierten Tropfen der Gymnoplasten zwischen 4 und 5 Std. zu wässern.

Polarisationsmikroskopisch zeigen die ausgespritzten Protoplasmafäden in den gestreckten Rindenpartien Doppelbrechung negativ zur tangentialen Richtung, an den abgerundeten Kappen der beiden Enden eine schwächere negative Doppelbrechung oder Isotropie. Bei Vermessung der beiden Zonen nach längerer Aufbewahrung der Objekte treten die Unterschiede in der Stärke der Doppelbrechung sukzessiv zurück. Aus den Befunden muß schon nach vorläufigen Überlegungen geschlossen werden, daß Verstreckung die Anisotropie der Außenlagen des Protoplasmas steigert, Nachlassen des mechanischen Insults den Effekt hemmt. Es kann nicht ausbleiben, daß bei dem Ausspritzen des Protoplasmas aus der Ausflußcapillare, möglicherweise hervorgerufen durch strukturelle Differenzen innerhalb des ausgespritzten Materials, neben stark gestreckten und meist im Durchmesser verringerten Abschnitten auch ziemlich gestauchte und dann im Durchmesser vergrößerte Partien miteinander wechseln. In solchem Falle zeigt sich ebenfalls die Anisotropie der durch Zug verstreckten Abschnitte der Protoplasmafäden gegenüber den durch Pressen gestauchten Zonen erhöht. Gelungene Versuchsserien, bei denen Protoplasmafäden übereinstimmender Herkunft unter verschiedenen Geschwindigkeiten ausgezogen werden konnten, lassen eine anfangs lineare, später langsam ansteigende Zunahme der Anisotropie und damit der Orientierung der protoplasmatischen Leptonen erkennen (Abb. 2). Wie außerdem einige vorläufige Versuche ergeben haben, zeigt sich der anisotrope Effekt nicht allein als Doppelbrechung, sondern wie bei der früheren Versuchsanordnung [7 e] auch als Beugungspolarisation [7 f].

Solche Ergebnisse sind zwar auch bereits aus dem polarisationsoptischen Verhalten von Protoplasmatropfen, welche in der bisher benutzten rheologischen Apparatur [7 e] im Lumen von Capillaren mit zugespitzten Enden bewegt worden sind, gefolgert worden [7 b—c, k] und werden auch jüngst in Versuchen mit mancherlei Seegeleiern durch Dan und Okazaki [2] bestätigt. Aber die quantitative Beziehung zwischen Verstreckungsrate der Protoplasmatropfen und Intensität der Doppelbrechung resultiert eher

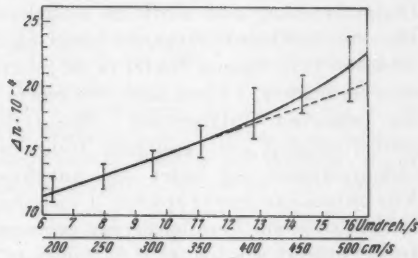


Abb. 2. Abhängigkeit des als Doppelbrechung ($\Delta n \cdot 10^{-4}$) ausgedrückten Orientierungsgrades der Leptonen von der Abzugsgeschwindigkeit (cm/s) bzw. der Umdrehungszahl/s der Petrischale.

aus solchen Versuchsserien mit Gymnoplasten, welche unter unterschiedlichen Abzugsgeschwindigkeiten aus den Ausflußcapillaren ausgespritzt werden¹. Zugleich beweisen die Befunde, daß es möglich ist, mittels der beschriebenen Versuchsanordnung die Orientierungsrate der protoplasmatischen Leptonen und als ihren Ausdruck die Doppelbrechung des Materials zu steigern. Der Gedanke, daß Spannungen im Protoplasma seine Doppelbrechung verändern können, ist freilich nicht neu, war aber in der Protoplasmatik bis soweit im wesentlichen eine theoretische Annahme. Wie durch die Befunde von Dan und Okazaki [2] wird der Einfluß von Zug (Streckung) auf geförderte, von Pressung (Druck) auf gehemmte Orientierung durch den Nachweis vermehrter bzw. herabgesetzter Doppelbrechung auch durch die dargelegten Ausflußversuche exakt belegt. Die erzielte Orientierungsrate hängt also — ganz in Bestätigung zu theoretischen Folgerungen Müllers [6] — außer von molekularen Daten bzw. dem chemischen Aufbau noch von einem weiteren Parameter, nämlich der „relativen Verlängerung“, dem Verstreckungsgrade oder der Abzugsgeschwindigkeit aus capillaren Spinddüsen ab. Schließlich sind die Versuchsergebnisse nur unter der Annahme des (wenigstens postmortalen) Vorkommens gestreckter Leptonen, welche durch den Ausspritzmechanismus zur Parallelisierung gebracht werden, verständlich. Wie schon früher gezeigt worden ist [7 h], bildet zu all solchen Folgerungen eine zukünftig zu erstrebende quantitativ auszugestaltende Technik der Polarisationsoptik die Voraussetzung.

Angemerkt sei zum Schlusse, daß nach Anwenden diverser Vitalfarbstoffe auf die fusionierten Gymnoplasten auch der Dichroismus, sofern messend vorgegangen wird, sehr empfindlich Veränderungen der Anisotropie erkennen läßt, so daß sich die quantitative Bestimmung des Dichroismus als brauchbarer Indikator der Variationen des Orientierungsgrades vorkommender (oder bei der Herichtung des Materials entstandener) Leptonen erweist. Über diese noch mit technischen Schwierigkeiten der Versuchsanstellung ringenden Analysen sei aber erst nach besserer Beherrschung der Meßtechnik näher berichtet.

Summary

At defined speeds threads of protoplasm have been drawn out mechanically from a fusion of isolated gymnoplasts using an experimental arrangement described by Gerendás [3]. The polarization device, as well as the method of measuring the birefringence by means of a variable azimuth compensator of fixed retardation, viz. a rotating $\lambda/30$ -mica plate, is the same as described formerly [7 g—i]. Then in dependence on the variable speeds of formation the protoplasmic threads show a different intensity of negative birefringence, and, what is more, it is found a distinct parallelism between birefringence, as an expression of the orientation rate of the leptones, and the speed of spinning. Always when a birefringent gel like protoplasm is put under tension, the intensity of its original birefringence or its orientation rate increases

¹ Durch meinen Aufenthalt zu Vorträgen und Diskussionen vor einem Jahre in den USA hat sich der Abschluß dieser Versuche leider verzögert; doch war es mir bereits damals möglich, dort in großen Zügen über die Befunde zu berichten.

(and in the reverse order). It is to conclude that in order to analyse the leptonic structures in dependence on the effective forces, there is a great need for a quantitative approach to the anisotropy of protoplasmic constituents.

Literatur

- [1] Balbach, H.: *Protoplasma* 26, 161 (1936).
- [2] Dan, K., and K. Okazaki: *J. Cell. and Comp. Physiol.* 38, 427 (1951).
- [3] Gerendás, M.: *Stud. Inst. Medic. Chemistry Univ. Szeged* 1, 47 (1942).
- [4] Küster, E.: (a) *Über Plasmaphropfungen* (Jena 1939). — (b) *Die Pflanzenzelle*, 2. Aufl., 43, 90, 737, 763 (Jena 1951).
- [5] Michel, W.: *Arch. exper. Zellforsch.* 20, 230 (1937).
- [6] Müller, F. Horst: *Dissert. Leipzig* 1941, auch in *Kolloid-Z.* 95, 138, 158 u. 160 (1941).
- [7] Pfeiffer, Hans H.: (a) *Nature* 133, 1054 (1936). — (b) *Fujii Jubil. Vol.*, 701 (Tokyo 1937). — (c) *Verh. D. Zool. Ges.* 39, 106 (1937). — (d) *Experimentelle Cytologie* 45, 51 f. (Chron. Bot. Co., Leiden 1940). — (e) *Protoplasma* 34, 347 (1940). — (f) *Ibid.* 36, 444 (1942). — (g) *Siegeszug der Mikroskopie*, 47, 55 (Frankfurt a. M. 1944). — (h) *Klin. Wochenschr.* 26, 383 (1948). — (i) *Das Polarisationsmikroskop als Meßinstrument in Biologie und Medizin*, 55, 64 (Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig 1949). — (k) *Proceed. VIIth internat. Bot. Congr. Stockholm* (in Druck).
- [8] Schmidt, W. J.: *Erg. Physiol.* 44, 27, 74 (1941).

Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien

Von

Karl Höfler und Helmuth Schindler

Mit 3 Textabbildungen

(Eingelangt am 12. November 1952)

I. Einleitung

Die Desmidiaceen sind durch große Mannigfaltigkeit der Zellgestalt ausgezeichnet, sie sind dadurch seit alters zu Lieblingen der morphologisch ausgerichteten Algenforscher geworden. Daß auch die zytologischen und zellphysiologischen Eigenschaften von Art zu Art großem Wechsel unterliegen, ist erst in jüngerer Zeit beachtet worden (Kopetzky-Rechtperg 1951/1950, Cholnoky und Höfler 1950, Höfler und Schindler 1951, Höfler 1951, Krebs 1952, Loub 1952, Hirn 1953).

Wir haben im Zuge unserer Vitalfärbungsversuche mit Hochmooralgen im Spätsommer 1952 Materialien untersucht, welche mehrere *Closterium*-Arten nebeneinander enthielten. Unser bestes Material stammte aus dem Ramsauer Torfmoor¹, es wurde hier im sogenannten quadratischen Wasserloch² gesammelt, einem sehr alten Torfstich, worin das Wasser etwa 1 m hoch steht und der niemals austrocknet oder bis zum Grund einfriert; es enthielt als Grundmasse *Oedogonium* sp. und darin — neben anderen Einzellern, unter denen *Glenodinium cinctum* dominierte — sehr reichlich *Closterium lineatum* Ehrbg., *Cl. juncidum* Ralfs var. *brevior* (Ralfs) Roy und *Cl. parvulum* Näg., minder häufig, aber auch reichlich *Cl. striolatum* Ehrbg., *Cl. diana* Ehrbg., *Cl. Leibleinii* Kütz., spärlicher *Cl. lunula* (Müll.) Nitzsch. und *Cl. gracile* Bréb., ganz vereinzelt *Cl. cynthia* De Notaris und *Cl. costatum* Corda. Ein gegenüber den anderen Wässern des Moores leicht erhöhter Nährstoffgehalt mag den Closterien zur Dominanz verholfen haben.

¹ Vgl. Höfler u. Schindler 1951, S. 139, und die Kartenskizze bei Cholnoky u. Schindler 1951, S. 226 („Standort V“).

² Es beherbergt seit der ersten Untersuchung im Jahr 1914 etwa die gleiche Algengesellschaft mit etlichen Arten, die im wenige Meter entfernten „Großtümpel“ des Ramsauer Torfmoors fehlen.

II. Versuche

Färbte man dieses Algenmaterial mit dem basischen Oxazinfarbstoff Brillantcresylblau³ 1:10.000 oder 1:5000, so fiel auf, daß die artverschiedenen Closterien sich zum Teil färbten, zum Teil völlig ungefärbt blieben.

Als stark färbbar (Abb. 1) erweist sich überall *Closterium lineatum*. Völlig farblos bleibt überall das gleich häufige oder noch häufigere, ja dominante *Closterium juncidum* var. *brevior*. Von den spärlicher, aber stetig vorhandenen Arten sind *Closterium Leibleinii* stark, *Cl. diana* mäßig stark, *Cl. parvulum* und *Cl. gracile* mäßig stark bis schwach gefärbt; von ungleich alten Membranhälften ist in bekannter Weise meist die ältere stärker, die jüngere schwächer tingiert. *Closterium striolatum* läßt, wie *juncidum-brevius*, jede Membranfärbung vermissen. Das verschiedene bzw. gegensätzliche Verhalten der unter den gleichen Außenbedingungen lebenden, derselben Biocönose angehörenden Arten war in zahlreichen Versuchen immer wieder zu beobachten.

Das gleiche ergab sich bei Behandlung mit Farblösungen, die durch Phosphatpufferung auf ein bestimmtes p_H gebracht worden waren. Zu den meisten Versuchen wurden gepufferte Lösungen verwendet; wir hielten die ganze Farbbadreihe vorrätig; wir arbeiteten aber vornehmlich mit vier p_H -Stufen, stark alkalisch (p_H um 10–11), schwach alkalisch, schwach sauer (p_H 4,8), stärker sauer (p_H 5,9). Überall fällt zunächst die Färbbarkeit oder Nichtfärbbarkeit der Zellmembran vor allem ins Auge; beide kehren in ziemlich weiten p_H -Grenzen in gleicher Weise wieder.

Bekanntlich findet man bei Versuchen in c_H -gestuften Farbbadreihen im allgemeinen dort, wo die Farbe in dissoziierter Form vorliegt, elektro-adsorptive Farbspeicherung in den Zellmembranen, dort aber, wo die Farbe in molekularer, permeierfähiger Form vorliegt, vitale Anfärbung im lebenden Protoplasten. Dazwischen liegt ein Übergangsbereich, wo Zellwände und Protoplasten sich färben. Beim Brillantcresylblau liegt die Umschlagszone, ähnlich wie beim Neutralrot, im neutralen Bereich der p_H -Reihe. Ein methodischer Vorteil des Brillantcresylblau liegt darin, daß die Farbbase im alkalischen Farbbad bei weitem nicht so schnell ausfällt wie das Neutralrot. Wir brachten die Algenproben auf den Objektträger, saugten rasch ab, setzten einige Tropfen Farblösung auf und verteilten die Algen mit Nadeln darin, legten, meist nach 10–12 Minuten, ein großes Deckglas auf und ersetzten durch vorsichtiges Durchsaugen mit Filtrierpapier die Farbe durch den gleichnamigen $n/150$ Phosphatpuffer, worin dann beobachtet wurde.

Aus den Membranen kann die Farbe mit ionisierten Salzlösungen durch Adsorptionsverdrängung ausgetrieben werden. Wir ließen zunächst auf die mit Brillantcresylblau gefärbten Materialien 0,5 n KCl einwirken⁴. Die

³ Die frisch geöffnete Farbpackung, die uns von der Fa. Merck, Darmstadt, in dankenswerter Weise überlassen wurde, trägt die Aufschrift: 1280, Brillantcresylblau, Mercks Präparate für Mikroskopie und Bakteriologie.

⁴ Die Lösung war aus n KCl mit karbonathaltigem Brunnenwasser verdünnt, dadurch wird die schädigende Wirkung durch reine, nicht äquilibrierte K-Ionen stark vermindert.



Membranen entfärbten sich rapid. *Closterium Leibleinii* war bald entfärbt, schon 2 Minuten nach dem Durchsaugen trat starke Plasmolyse ein und der „Vorraum“ erschien violett. Innen im Protoplasten traten kleine dunkelblaue Kügelchen auf. Auch die Zellen von *Closterium lineatum* wurden ziemlich rasch entfärbt. Nach 10–12 Minuten sind die meisten Zellmembranen farblos, manche zeigen noch ein zartes Lila. Dafür tritt die Farbe jetzt im Protoplasten auf: durch das Salz wird die Ionisation zurückgedrängt und die Farbmoleküle können permeieren. Die Mehrzahl der Zellen zeigt himmelblaue Farbkörnchen. Manche haben diffus kobaltblau gefärbte Vakuolen, dafür keine himmelblauen Fällungskügelchen. — *Closterium striolatum* und *Cl. juncidum*, die vorher keine Farbe in den Membranen gespeichert haben, bleiben ungefärbt (zeigen keine Aufnahme aus dem Detritus freigesetzten Farbstoffes).

Verwendet man zur ersten Färbung Lösungen, die außer der Farbe ein ionisiertes Neutralsalz enthalten, so wirkt dieses blockierend und die Zellmembranen, die sich sonst elektroadsorptiv anfärben, bleiben ungefärbt. Die grundlegende Beobachtung findet sich schon bei Pfeffer (1886), die Erscheinung ist in jüngerer Zeit vielfach studiert (Czaja 1934–1936, Drawert 1937, Borris 1937, Rehm 1938 u. a., Höfler und Stiegler 1947, Wiesner 1951), zuletzt an verschiedenen Gewebszellen höherer Pflanzen von Küster (1951) vergleichend untersucht worden, der Methylenblau verschiedener Herkunft und als Salz $2n \text{ KNO}_3$ verwendet.

Die blockierende Wirkung ist je nach der Konzentration und Ionenwertigkeit des Salzes verschieden stark. Der Brillanteresylblaulösung wurde $n/2 \text{ KCl}$, welches alle Algen plasmolysiert, oder $n/3 \text{ KCl}$, welches den meisten Algen gegenüber schwach hypertonisch ist, zugesetzt. Die Zellulosemembranen der meisten Objekte färben sich nicht.

In einem Versuch wurde mit $1 : 7500$ Farbe + $n/3 \text{ KCl}$ gefärbt und nach 7 Minuten reine $n/3 \text{ KCl}$ -Lösung durchgesaugt: die Closterien zeigten sich

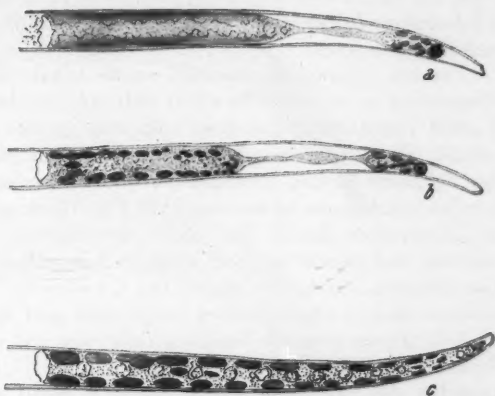


Abb. 2. *Closterium lineatum*. Vakuolenteilung und -kontraktion nach Vitalfärbung mit Brillanteresylblau. Vgl. Text.

Abb. 1. Ungleiche Färbbarkeit verschiedener Closterien mit Brillanteresylblau, a) *Closterium lineatum*, b) *Cl. Leibleinii*, c) *Cl. diana*, d) *Cl. parvulum*, e) *Cl. gracile*, f) *Cl. striolatum*, g) *Cl. juncidum* var. *brevior*.

plasmolysiert und ungefärbt. Im Schwesterversuch wurde zuerst mit 1 : 5000 Brillantcresylblau kurz (6 Minuten) gefärbt und dann Brillantcresylblau 1 : 7500 — $n/5$ KCl durchgesaugt. Die Zellwand hat hier kurze Zeit speichern können. Eine beobachtete lebende *Cl. lineatum*-Zelle läßt schwache Plasmolyse eintreten, und die Farbe geht in den Protoplasten: die Endvakuole erscheint intensiv sattblau, die Hauptvakuole noch gleichmäßig und diffus graublau gefärbt (Abb. 2 a). Bei weiterer Beobachtung sieht man Vakuolenkontraktion eintreten. Der Zellsafttraum zerfällt dabei in Stücke, die sich langsam verkleinern. Der Fortgang der Kontraktion wurde beobachtet, sie hatte 50 Minuten nach dem Zusatz der Farb-Salz-Lösung den in Abb. 2 b dargestellten Grad erreicht. Eine Stunde später waren in vielen *Cl. lineatum*-Zellen des Präparates die Teilvakuolen ähnlich zu Längsreihen angeordnet.

Um bei *Closterium lineatum* solche Inhaltsfärbung rascher und ohne Plasmolyse zu erzielen, bewährt sich ein Farbbad, welches die Farbe in 1 : 5000 Verdünnung und dazu noch eine geringe hypotonische Menge KCl enthält. Hier tritt zuerst Membranfärbung ein, nach einiger Zeit aber geht der Farbstoff in den Protoplasten und massenhaft konvexe Teilvakuolen werden sichtbar, die in den durch die Plastidenleisten abgegrenzten Räumen in Längsreihen liegen. Bei solcher Behandlung ließ sich also Vakuolenfärbung und darauf folgend schönste Vakuolenzerklüftung und -kontraktion erzielen. Solche ist zuerst bei Cholnoky und Höfler (1950) für mehrere andere Desmidiaceen beschrieben und abgebildet worden. — Die in Abb. 2 c dargestellte *lineatum*-Zelle war mit einer Lösung von 1 : 5500 Brillantcresylblau + 0,05 n KCl behandelt. Bei *Cl. lineatum* färbten sich hier zunächst die Zellwände blau. $n/20$ KCl reicht also bei dieser Art zur Blockierung der Färbung nicht aus. Die Membranen anderer Algen, die sich im Kontrollversuch ohne Salzzusatz färben, blieben farblos. Als nach 50 Minuten wieder beobachtet wurde, war auch bei *Cl. lineatum* die Farbe aus der Membran in den Protoplasten übergetreten: die Endvakuole war dunkler violettblau, die Teilstücke des Zellsafttraumes waren heller kobaltblau gefärbt; die Plastiden und Pyrenoide der Zelle waren intakt.

Solche Versuche über Vakuolenteilung sind bei *Closterium lineatum* gut reproduzierbar. In stärker alkalischem Farbbad, wo sich die Farbe in permeierfähigem Zustand befindet, tritt auch ohne Salzzusatz nach gewisser Zeit Vitalfärbung im Protoplasten ein. Aber Zellwandfärbung geht auch hier zeitlich der Vakuolenfärbung voran. In einem Versuch vom 23. September war das Algenmaterial 16 Minuten lang in Brillantcresylblau 1 : 10.000 p_R 10—11 gefärbt und dann im gleichnamigen Puffer aufbewahrt. Nach 1 Stunde war bei *Cl. lineatum* die Membran noch zart lila gefärbt, die Endvakuole, die am reichsten gespeichert hatte, dunkel schwarzlila und die kontrahierten, in Reihen liegenden Teilvakuolen kobaltblau gefärbt; die Teilstücke waren im Durchschnitt um 10μ lang und $3-4 \mu$ breit.

Von den anderen Versuchsalgen neigen zur Vakuolenteilung besonders *Closterium diana*e, für das der zeitliche Verlauf der Versuche schon bei Cholnoky und Höfler (1950, S. 166 f.) ausführlich geschildert wurde, und *Closterium Leibleinii*. Bei letzterem färben sich die Membranen zartlila,

die Endvakuole intensiv, die Teilvakuolen schwächer lila, wobei der Farbton hier in den beiderlei Vakuolen der gleiche ist. Hervorzuheben ist daß lebendes *Closterium juncidum-brevius* auch im stark alkalischen Farbbad stets gänzlich ungefärbt, d. h. auch ohne Zellsaftfärbung gefunden wurde.

Zur Entfärbung der tingierten Zellwände haben wir meist nicht wie im obigen Versuch Kaliumchlorid, sondern Calciumchlorid verwendet, und zwar in der mäßig stark hypertonen Konzentration von 0,2 mol (= 0,4 n) CaCl_2 . Die Entfärbung erfolgt hier rasch. In einem Versuch vom 24. September war mit saurer Brillanteresylblaulösung 1 : 5000, p_H 3,9, 10 Minuten



Abb. 5. *Closterium Leibleinii*, a) behandelt mit Brillanteresylblau und CaCl_2 $\frac{1}{3}$ mol CaCl_2 : Vorraumfärbung, b) behandelt mit Thionin und CaCl_2 : Fällung von Farbkristallnadeln, links bei mittlerer, rechts bei hoher Einstellung, vgl. Text, S. 304.

lang gefärbt und sodann Puffer vom p_H 3,9 durch das Präparat geleitet worden. *Cl. lineatum* war wie immer sehr intensiv tingiert, auch bei zwei *Closterium-lunula*-Zellen war die Membran stark violett gefärbt; bei *Cl. parvulum* war sie zart, aber deutlich lila, bei *striolatum* und *juncidum* wie immer völlig ungefärbt. Nach 18 Minuten wurde 0,2 mol CaCl_2 durchgesaugt. *Cl. lunula* entfärbt sich sofort gänzlich. Lebendes *Cl. lineatum* verblaßt (während tote Membranen voll lila bleiben⁵). Als nach 15 Minuten beobachtet wurde, waren aber in zahlreichen lebenden Zellen die Membranen gänzlich entfärbt, die Protoplasten unter Längsabhebung normal plasmolysiert. — Auffällig verhält sich *Closterium Leibleinii*. Es plasmolysiert konvex und normal, die Zellwände geben unter der Wirkung des Salzes allen Farbstoff ab, aber dieser sammelt sich, wie in Abb. 5a dargestellt, im Vorraum zwischen der Zellwand und dem Protoplasten. Der Vorraum er-

⁵ Tote Protoplasten und alte leere Zellmembranen färben sich bei jedem p_H zum orthochromatischen Farbton des angewandten Farbstoffes, und diese Färbung ist „salzfest“, d. h. durch CaCl_2 nicht auswaschbar. Vgl. Höfler u. Schindler 1952.

scheint diffus violett gefärbt. Das Innere des Protoplasten ist dabei nicht im mindesten gefärbt, der aus der Zellmembran ausgetriebene Farbstoff dringt also wohl nicht durchs Plasma ein. Dieses Verhalten wurde von uns bei saurer Reaktion des vorangegangenen Farbbades beobachtet. Wahrscheinlich kondensieren die aus der Membran getriebenen Farbkationen nicht zu permeierfähigen Molekülen (obwohl ja die einbettende CaCl_2 -Lösung nicht mehr sauer ist). Andererseits kann der Farbstoff, der den Vorraum diffus erfüllt, nicht oder nur schwer durch die Zellwand exosmieren. — Die gezeichnete Zelle wurde längere Zeit beobachtet, sie zeigte die Vorraumfärbung noch unvermindert nach 45 Minuten, als der Versuch abgebrochen wurde.

Borriss hat analoge Bilder an *Allium cepa* zuerst beobachtet und eingehend studiert. Er erhält „Negativfärbung“ (1937, S. 28, Fig. 4) an Innenepidermen der Zwiebeln, die er drei Stunden in Methylenblaulösung 1:5000 kräftig vorfärbt und alsdann für 15 bis 20 Minuten in überschüssige 0,4-n- KNO_3 -Lösung legt. Zellwand und Vakuole sind farblos. Der anfänglich in Form von Kügelchen aus der Membran nach innen gedrängte Farbstoff ist wieder gelöst und das „Farbsalz“ färbt diffus den extraplasmatischen Raum. Wie Borriss ausführt, „können die Erscheinungen, unter denen diese Entfärbung vor sich geht, sehr mannigfache sein und hängen in der Hauptsache von den Beziehungen zwischen Farbstoff und Elektrolyt, d. h. von den Eigenschaften des gebildeten Farbsalzes ab. Nach seiner Verdrängung durch die Kationen bildet das Farbsalz im extraplasmatischen Raum innerhalb der Zellmembran eine hochkonzentrierte Lösung, da offenbar die Diffusion nach außen durch die Kutikula, vielleicht auch durch die Besetzung der Membranporen mit Kationen sehr erschwert ist. (Daß hier aber das Vorhandensein der Kutikula wesentlich ist, wird durch das Verhalten der Algenzellen bewiesen, bei denen immer nur eine diffuse Entfärbung in die Lösung beobachtet werden konnte.)“ — Wir haben nun das Borriss-Phänomen doch auch an Algen beobachtet, aber unter den zahlreichen Arten, die wir in unseren Hochmoorproben (auch im Zuge unserer Studien über salz feste oder salzempfindliche Färbung von Algen-gallerten, Höfler u. Schindler 1952) unter den Augen hatten, bisher nur an *Closterium diana* (abgebildet bei Höfler u. Schindler 1951, S. 140) und nunmehr bei *Cl. Leibleinii*; wie erwähnt, war nach Adsorptivfärbung mit ionisierter Toluidinblau- bzw. Brillantcresylblau-Lösung der Membranfarbstoff durch CaCl_2 -Lösung ausgetrieben worden. Wie das Zustandekommen der Vorraumfärbung etwa von der spezifischen Membranbeschaffenheit abhängt, bleibt zu prüfen.

Auch *Closterium lunula* mit seiner eisenfreien, einfachen, nicht inkrustierten Zellmembran (vgl. Höfler 1926, S. 118) färbt sich im Farbbad und entfärbt beim Salzzutritt. Wir gehen aber auf unsere mit dieser Art angestellten Versuche hier nicht näher ein; denn Loub (1951) hat jüngst gezeigt und wir fanden bestätigt, daß *Cl. lunula* weitaus am empfindlichsten unter allen der Farbbehandlung unterworfenen Desmidiaceen ist. Wenn aber eine Schädigung des Protoplasten erfolgt, die den Verlust der Semipermeabilität zur Folge hat, so können Stoffe in die Membran übertreten und diese sekundär salzfest färbbar machen (vgl. Brauner 1932).

Über unsere Versuche mit Neutralrot ist nur kurz zu berichten, da sie ähnlich wie die beschriebenen Versuche mit Brillantcresylblau verliefen. Bei p_H 3,9 und p_H 6,3 zeigen die verglichenen Closterien die gleichen Unterschiede in der Intensität der Membranfärbung. *Cl. lineatum* färbt sich stets

am stärksten, *juncidum-brevius* gar nicht. Im alkalischen Farbbad färbt sich (in frisch bereiteter Lösung, wo noch keine Farbbase ausgefallen ist) bei *Cl. lineatum* die Zellwand überall schön rot; schon nach kurzem zeigt sich im Protoplasten auch die Endvakuole deutlich gefärbt, später erscheint auch Färbung der Hauptvakuole. In einem bestimmten Versuch (12. September) wurde mit entsprechendem Phosphatpuffer versetzte Traubenzuckerlösung von 0,6 mol (welche naturgemäß keine Adsorptionsverdrängung bewirkt) durch das Präparat gesaugt. Es tritt normale Plasmolyse ein und man erkennt, daß die lebenden Zellen jetzt nur mehr Vakuolenfärbung haben, während die Membranen farblos sind: nur die innerste Schicht der freigelegten Membranen zeigt deutliche Rotfärbung. Diese ist in den älteren Zellhälften bzw. Gürtelbändern viel stärker als in den jüngeren. Die differente, die Farbe festhaltende Schicht wurde in unseren Protokollen zunächst als „Innenkutikula“ bezeichnet; wir wollen sie im folgenden lieber nur Innenlage der Zellmembran nennen. Sie hält die Farbe in verstärktem Maße fest. Wir haben solche elektiv gefärbte Innenschichten in den weiteren Versuchen vielfach beobachtet. Hervorzuheben ist, daß selbst bei *Cl. juncidum brevius*, wo auch im alkalischen Bad nicht die mindeste Protoplastenfärbung erfolgt, eine solche zarte rote Innenlage an den älteren Membran- bzw. Gürtelbandteilen wahrnehmbar wird, wobei die Färbung an der Grenze gegen die jüngeren Membranteile plötzlich abbricht.

Solche elektiv gefärbte Innenlagen wurden weiterhin auch in Präparaten, die mit alkalischer Brillanteresylblaulösung gefärbt worden waren, beobachtet, ja wir konnten feststellen, daß in manchen Fällen selbst nach Durchleitung von CaCl_2 -Lösung, welche ja die Zellwand übrigens ganz entfärbt, allein diese Innenschicht als fein ausgezogene blaue Linie sichtbar bleibt. Bei stärkerer Vergrößerung wurde die Dicke dieser blau verbleibenden Membranschicht bei *Cl. lineatum* auf ca. $0,5 \mu$ geschätzt; sie erreicht an dieser Art bei bester Ausbildung etwa ein Viertel der Dicke der Zellwand. Meist bleibt sie wesentlich schmaler. Die Färbung der Innenlage erscheint gegen ionisierte Salzlösungen — zum Unterschied von den übrigen Zellwandschichten — einigermaßen beständig, also „salzfest“.

Wir haben an weiteren basischen Farbstoffen Toluylenblau, Toluidinblau und Thionin angewandt. Die relative Färbung der *Closterium*-Arten war überall die gleiche. Im Toluylenblau wird die Membran von *Cl. lineatum* dunkelviolet, von *Leibleinii* zart graublau, bei *juncidum-brevius* und *striolatum* bleibt sie ungefärbt.

Das Thionin ist die Stammsubstanz von Methylenblau; es hat $2\text{H}_2\text{N}$ -Gruppen statt der $2(\text{CH}_3)_2\text{N}$ -Gruppen des letzteren. In Thioninlösung 1:2000 speichert *Closterium lineatum* lilarot, die Zellwand von *Leibleinii* ist lila, die von *dianae* und *parvulum* zarter lila bis graulila gefärbt, *striolatum* und *juncidum-brevius* bleiben ungefärbt. Nach der am 4. Oktober erfolgten Rückkehr nach Wien wurden die Versuche wiederholt. Saure Thioninlösung (1:5000, p_{H} 4,8) ergab stärkere Färbung, z. B. eine gleichmäßige Tiefilafärbung bei *Cl. dianae* und *parvulum*, eine intensiv lilarote Membranfärbung beim selteneren *Closterium costatum*. — Auffällig war diesmal *Cl. juncidum-brevius*. Die meisten Zellen waren wieder wie sonst

ungefärbt geblieben, vereinzelt fanden sich aber Zellen, welche eine deutliche Anfärbung der Membran erkennen ließen, die von den beiden Zellpolen her fortschreitend eintrat; solche Färbung an *Cl. juncidum* wurde nur beim Thionin unter den von uns verwendeten Farbstoffen beobachtet; *Cl. lineatum* war wie sonst stark gefärbt, *Cl. striolatum* durchwegs ungefärbt. Beim gleichzeitigen Kontrollversuch mit Brillantcresylblau war alles *Cl. juncidum-brevius* ungefärbt; unter Hunderten durchmusterten Zellen fand sich keine gefärbte, während die übrigen Arten in der gewohnten Abstufung tingiert waren. Die Fähigkeit, einzelne *juncidum*-Individuen zu färben, scheint also dem Thionin eigentümlich zu sein.

Schon in den Ramsauer Versuchen haben wir am frisch eingebrachten Material die mit Thionin gefärbten Präparate mit CaCl_2 nachbehandelt. In einem Versuch vom 24. September wurde 12 Minuten mit saurer Thioninlösung 1:5000 (p_{H} 3,95) gefärbt, dann blieben die Zellen längere Zeit (71 Minuten) im Puffer vom p_{H} 3,95, worauf $\frac{1}{3}$ mol CaCl_2 durch das Präparat gesaugt wird. Bei *Closterium lineatum* trat normale konkave Plasmolyse von den Längswänden ein, die Membran wurde viel lichter, bei der Mehrzahl der Zellen wurde sie aber nicht ganz entfärbt. Das ungefärbte *Cl. juncidum-brevius* ließ schwache Plasmolyse eintreten. An *Cl. Leibleinii* hatte die Membran eine dunkellila Färbung angenommen; in CaCl_2 trat gute normale großbuchtige Plasmolyse ein: die Membran bleibt lila, obwohl sie vom CaCl_2 -Strom durchdrungen wird. Eine Diffusfärbung des Vorraums (wie im Schwesterversuch in Brillantcresylblau) erfolgte nicht. Genauere Beobachtung ließ aber erkennen, daß innen an der Zellwand Farbstoff in Form feiner Kristallnadelchen ausgefallen war. Die Nadeln waren bis $5-7\ \mu$ lang und etwa $0,4\ \mu$ dick. Sie fanden sich dort, wo das Plasma abgehoben war, d. h. an den positiven Plasmolyseorten. Vgl. Abb. 5b. — Borriß (l. c. S. 42) hat die Bildung ähnlicher, dickerer Kristallnadeln in *Allium*-Zellen beobachtet, nicht aber an Algenzellen. Pekarek (1958) hat die Kristallbildung bei Zwiebelzellen, die mit Azur I gefärbt und mit KNO_3 nachbehandelt wurden, eingehend studiert.

Endlich wurde die Färbbarkeit der Closterien mit Akridinorange orientierend untersucht. Im Hellfeld zeigten die verglichenen Arten gelbe bis braungelbe Membranfärbung in der gleichen Abstufung, wie sie für die anderen basischen Farbstoffe beschrieben wurde. Die Untersuchung im Fluoreszenzlicht, welche in Wien an einem Material, das in der Ramsau vor der Abreise frisch gesammelt worden war, vorgenommen wurde, brachte für unseren Zweck eine Enttäuschung. Closterien löschen die Fluoreszenz. So werden die im Hellfeld tingierten Membranen im UV-Licht schwer sichtbar oder unsichtbar. Auch bei der Prüfung auf Eigenfluoreszenz zeigten die (ungefärbten) Closterien totale oder partielle Fluoreszenzlöschung. Die *Oedogonium*-Watten des Materials zeigten zartrote Chloroplasten-Fluoreszenz; darüberliegende Zellen von *Closterium striolatum*, *juncidum-brevius*, *lineatum* hoben sich völlig dunkel ab, wobei nicht nur die Fluoreszenz der eigenen Plastiden, sondern auch die der darunterliegenden Algenfäden gelöscht wird. Durch die Zellwände von *Cl. lineatum* wird die Fluoreszenz stark vermindert, nicht völlig gelöscht (während die Pla-

stiden von *Cl. diana*, *parvulum*, *Leibleinii* noch in rotem Fluoreszenzlicht sichtbar sind). Der Effekt beruht zweifellos auf dem Eisengehalt der Closterien-Membran (vgl. Förster 1951). Auch andere eiseninkrustierte Membranen oder Membranteile, besonders auffällig die Eisengürtel der Pleurotaenien, bewirken vollständige Fluoreszenzlöschung.

III. Zusammenfassung und Besprechung

Unsere Beobachtungen haben eindeutig ergeben, daß die Vitalfärbbarkeit in der Gattung *Closterium* von Art zu Art stark verschieden ist. Zwar färben sich tote Zellen, auch leere tote Zellwände, die mit aus dem Protoplasten stammenden Stoffen infiltriert sind, vielfach im orthochromatischen Ton des betreffenden Farbstoffes, und diese Färbung erweist sich als „salzfest“, wenn CaCl_2 durch die Präparate geleitet wird. Dagegen wechselt die Färbbarkeit der lebenden intakten Zellen von Art zu Art in weitesten Grenzen.

Ähnliche artspezifische Unterschiede im Färbeverhalten sind uns von anderen Desmidiaceen bekannt. Doch gehen wir auf diese Beobachtungen hier nicht ein, denn die allgemeinen Fragen lassen sich an Hand des gegensätzlichen Verhaltens der von uns geprüften *Closterium*-Arten allein erörtern.

Zwei Befunde erscheinen der Festhaltung wert:

I. Bei den einen Arten ist die Zellmembran elektroadsorptiv anfärbbar, bei den anderen nicht.

II. Das Maß der endlichen vitalen Farbspeicherung im Protoplasten ist weitgehend abhängig vom Maß der vorangegangenen Farbspeicherung in der Membran.

Diesen beiden Ergebnissen der vergleichenden Versuche kommt wohl ein allgemeineres zellphysiologisches Interesse zu. Sie weisen dem Speicherungsvermögen der Zellmembranen, welches als artspezifisch erkannt wurde, eine erhöhte Rolle bei der Stoffaufnahme der Zelle zu.

Zu I: Unser Nachweis, daß das Vermögen der Farbbindung, im besonderen der Kationenadsorption bei den einzelligen Zieralgen von Art zu Art in weiten Grenzen schwankt, ist wohl neu. Versucht man, das Phänomen der Erklärung zuzuführen, so wird man vor allem an anatomische Unterschiede im Bau der Zellwände denken.

Wir erinnern uns kurz an das, was über den Feinbau der Desmidiaceenmembranen bekannt ist. Lütkenmüller (1902) hat in seiner Untersuchung, die als klassisch bezeichnet werden darf, gezeigt, daß die Zellwand der placodermen Desmidiaceen (= Desmidiales) aus mehreren, chemisch differenten Schichten aufgebaut ist. Beim großen tropischen *Closterium turgidum* Ehrb. *subspec. giganteum* Nordst., aber auch bei den von uns untersuchten Arten *Cl. lineatum* und *angustum*, konnte er an Mikrotomschnitten zwei Zellhautschichten sehr deutlich unterscheiden. Die innere ist fast farblos oder gelb, die äußere stets dunkler gefärbt als die innere; der stärkeren Färbung entspricht ein erhöhter Eisengehalt. Allgemein, d. h. auch bei eisenfreien Arten, ist die innere Schicht strukturlos und besteht zur Hauptsache aus Zellulose, die mit den üblichen Reagenzien nachweisbar ist, die äußere erscheint imprägniert mit Substanzen, welche sie widerstandsfähig gegen

Cuoxam machen, das auch nach mehrstündiger Einwirkung keine merkliche Quellung hervorruft. In der Gattung *Closterium* sind bei der Mehrzahl der Arten (durch Fuchsin oder Methylviolett und essigsäures Kalium) Poren nachweisbar; der Porenapparat fehlt hingegen bei etlichen kleineren Arten, unter denen (*S. 37*) *Cl. diana*, *parvulum*, *gracile* genannt werden. Die komplizierten, beim „Cosmariumentyp“ verbreiteten Porenorgane mit Porenzwiebeln, Prismengallerte und Endnelken fehlen in der Gattung *Closterium* stets völlig. — Van Wisselingh (1912, *S. 347, 357*, vgl. 1924, *S. 73, 223*) hat die Zellwand von *Closterium* erneut untersucht. Er arbeitet mit *Cl. Ehrenbergii* Menegh und *Cl. acerosum* (Schrank) Ehrb. Er unterscheidet, von außen her, die folgenden Schichten: erst ein dünnes, einer Cuticula ähnliches Schichtchen, dann eine Lage, die fast zellulosefrei ist (*acerosum*) oder schwächere Zellulosereaktion zeigt (*Ehrenbergii*), und innen eine zellulosereiche Schicht. Neben der Zellulose kommt in den Wänden eine Substanz vor, die durch Rutheniumrot lebhaft gefärbt wird und sich durch Erhitzung mit Glycerin auf 300° C entfernen läßt; van Wisselingh bezeichnet diese Substanz nicht einfach als Pektin; sie „ist vielleicht ein Gemenge verschiedener chemischer Verbindungen“. Nach Kinzels (1953) neuen Untersuchungen an Algengallerten läßt sich annehmen, daß diese Substanz durch den Gehalt an sauren Gruppen (wohl COOH-Gruppen) ausgezeichnet ist.

Zur Frage der Vitalfärbbarkeit hat Prát schon 1916 beobachtet und 1931 mitgeteilt, daß die Zellwand von lebendem *Closterium Ehrenbergii* bei Behandlung mit Vesuvín farblos bleibt, während sich die Membranen getöteter Zellen rasch anfärben. Bei *Cl. acerosum* gab Färbung mit 0,001% Janusgrün ähnliche Unterschiede. Brauner (1953, *S. 201*) hat Prát's Versuche an *Closterium moniliferum* wiederholt und sehr erweitert. Er zeigt, daß die Art des Abtötens für das Färbbarwerden entscheidend ist. Er überprüft an der genannten Art auch das Verhalten gegen reine und Ca-blockierte Methylenblaulösung. 0,01% Lösung färbt die Membranen lebender und abgestorbener Zellen gleich intensiv, bei Zusatz von 0,5 n CaCl₂ unterbleibt jede Färbung, auch die toter Zellen. Chrysoidin und Neutralrot wurden auch von den Wänden lebender Zellen rasch gespeichert. Brauner nimmt an, daß in Prát's Versuchen Vesuvín und Janusgrün deshalb von der lebenden Membran nicht gespeichert werden, weil sie zu den grobdispersen basischen Farbstoffen gehören; er rechnete damit, „daß das beobachtete Phänomen durch variable Ultrafiltereigenschaften der Closterienschale hervorgerufen worden ist, wobei die Porenweite der (mäßig dichten!) Membran erst verhältnismäßig großmizellaren Körpern gegenüber den Wert eines permeationsbegrenzenden Faktors gewinnen konnte. Tatsächlich war in meinen Versuchen festzustellen, daß diffusiblere Farbstoffe, wie Chrysoidin, Neutralrot oder Methylenblau, auch von den Wänden lebender Closterien in kürzester Zeit gespeichert werden, und zwar keineswegs schwächer als von totem Material“. — Bei Färbung mit Janusgrünlösung bestätigt Brauner nur bei Verwendung mittlerer Farbkonzentration (0,005%) die von Prát gefundenen Unterschiede. Er beobachtet ferner an einer älteren Kultur von *Cl. moniliferum*, daß in diesem Farbbad von den leeren Schalen abgestorbener Individuen manche völlig farblos blieben, andere tief indigoblau wurden, und weiter, daß die unfärbbaren gelblich und von Eisen imprägniert, die färbbaren Schalen frei von Eisen (wenigstens nicht sichtbar tingiert) waren. Die Anfärbbarkeit würde danach vom Fe-Gehalt abhängen. Tatsächlich wirkte ein Zusatz von 0,001 n FeCl₃ zum Farbbad hemmend, von 0,05 n FeCl₃ völlig blockierend auf die Aufnahme von Janusgrün. Brauner schließt zusammenfassend, daß der Permeationsgrad der Zellwand bzw. die „Porenweite“ der Membran den grobdispersen Farbstoffen gegenüber limitierend wirkt und verweist auf van Wisselingh's Befund, wonach die Closterienmembran von einem cuticulaartigen Häutchen überzogen sei.

Van Wisselingh, Prát und Brauner haben nur mit wenigen *Closterium*-Arten, die auch außerhalb der Hochmoore leben, gearbeitet.

Was nun unsere Befunde zum artspezifisch verschiedenen Farbspeichervermögen betrifft, so erscheint es vorläufig ganz wohl möglich, daß eine äußerste, schwer durchlässige „Cuticula“ bei den nichtfärbbaren Arten den Eintritt der Farbe ins Innere der Membran erschwert. Dann würden den von uns nachgewiesenen Unterschieden der Färbbarkeit hypothetische, vordem nicht bekannte Unterschiede im Feinbau der Membran entsprechen, derart, daß z. B. *Closterien striolatum* und *juncidum* von einer differentiellen, mikroskopisch nicht sichtbaren, schwer durchlässigen „Cuticula“ umkleidet wären. Freilich fanden wir die Membranen auch unfärbbar mit leicht diffusiblen Farbstoffen (Neutralrot). Auch spricht die Plasmolysierbarkeit der *striolatum*-Zellen mit Zucker, also die Wegsamkeit der Membranen für die großen Zuckermoleküle, dagegen, im Permeationswiderstand der Zellwände die Ursache der Nichtfärbbarkeit zu sehen.

Was die Beziehung der Eisenimprägnierung zur Membranfärbbarkeit betrifft, so führen unsere Beobachtungen über das Färbverhalten verschiedener Arten allerdings zu einer anderen Auffassung als der von Brauner geäußerten. Der ungleiche Fe-Gehalt bzw. die ungleiche Befähigung der *Closterium*-Spezies, Membraneisen zu speichern, ist seit langem bekannt (vgl. Höfler 1926, S. 116, 124—126, 147). Wir führten mit unserem Material die Eisenprobe mit gelbem bzw. rotem Blutlaugensalz durch und fanden dunkelblaue Membranfärbung, also reichsten Fe-Gehalt bei *Closterium lineatum*, starke Blaufärbung bei *Leibleinii*, gute positive Reaktion auch bei *parvulum*, *dianae*, *gracile*. Die gut färbbaren Zellmembranen sind demnach eisenreich, die des am stärksten farbspeichernden *Cl. lineatum* am eisenreichsten. Hier „blockiert“ also das in der Membran gebundene Eisen die Farbaufnahme nicht. Es scheinen vielmehr die gleichen Valenzen zu sein, welche im natürlichen Milieu das Eisen binden und im Versuch die Farbanreicherung fördern. Doch wird die Farbe chemisch nicht so fest gebunden, daß sie nicht durch CaCl_2 -Lösung (wenn auch manchmal verzögert) auswaschbar wäre.

Andererseits findet sich elektroadsorptive Farbbindung auch in ganz eisenfreien Membranen, wie sonst so auch in der Gattung *Closterium*; so z. B. bei *Cl. lunula*, welches ja (Höfler 1926) in der Membran kein Eisen hat.

An *Cl. juncidum* und *striolatum*, welche Membraneisen besitzen, beobachteten wir, daß nach kürzerem Verweilen im gelben Blutlaugensalz und folgendem Zusatz von HCl die Berlinerblaureaktion verzögert eintrat, ja völlig ausblieb. Durch Abkochen getötete Zellen beider Arten gaben gute Eisenreaktion. Es bleibt also noch zu entscheiden, ob bei diesen Arten eine schwer durchlässige „Cuticula“ anzunehmen ist oder ob etwa bei ihnen das Eisen in der Membran der lebenden Zelle, in anderer Form als sonst gebunden, wirklich im Sinne Brauners blockierend wirkt und dadurch die Adsorption der Farbe verhindert.

Zu II: Auf welchen Ursachen das artspezifisch ungleiche Farbspeichervermögen der Zellmembranen auch beruhen mag, — klar ist, daß durch

die Größe der Membranspeicherung auch das Ausmaß der nachherigen Vitalfärbung, d. h. der Farbspeicherung im Protoplasten bestimmt wird. Wo zuerst Membranspeicherung eintritt, erfolgt sie ganz oder vorwiegend auf elektroadsorptivem Weg, wie aus der Auswaschbarkeit mit CaCl_2 hervorgeht, oder beruht doch auf nur lockerer chemischer Bindung. Obwohl nun die Farbkationen als solche nicht permeieren können (Pecksieder 1950, Höfler und Schindler (1951), geht aber der zuerst nur von den Zellwänden gespeicherte Farbstoff nachher doch auch ins Protoplasteninnere.

Der Mechanismus der Ionenaufnahme steht bekanntlich zur Zeit im Vordergrund der Diskussion über den Mineralstoffwechsel der höheren Pflanzen. Man vgl. z. B. Burströms (1949, 1951) übersichtliche Referate. — Lundegårdh und seine Schule verlegen die Kationenadsorption ins „Plasmalemma“ bzw. in eine physikalische, als Z-Schicht (1941, S. 550) bezeichnete Oberflächenschicht des Protoplasmas. Für die Bindung der Nährsalzkationen werden sauer dissoziierte Gruppen der Proteine oder andere negativ geladene Molekülgruppen der Plasmagrenzschichten verantwortlich gemacht. Für die Anionenaufnahme wird ein anderer Mechanismus gefordert (Lundegårdhs „Anionenatmung“). Arisz und seine Schule lehnen die zweierlei Mechanismen ab. — Die theoretischen Vorstellungen auch von der Rolle der Zelloberfläche können zellphysiologisch nicht voll befriedigen, soweit sie sich nicht auf Beobachtungen an der Zelle stützen — oder, wo solche praktisch noch untunlich sind, doch auf Modellversuche an der Zelle. Als solches Modell für die Aufnahme der Nährsalzkationen kann aber vielleicht in gewissen Grenzen die Aufnahme der Farbkationen dienen, die den Vorteil direkter mikroskopischer Sichtbarkeit bietet⁶.

Czaja hat das dauernde Verdienst, auf die Rolle der Membranadsorption bei der Stoffaufnahme in die Zelle zuerst hingewiesen zu haben (1936, S. 92, 98, 116).

Er behandelt Spirogyren mit stark verdünnter Toluidinblaulösung (in bidest. H_2O oder in Leitungswasser bei p_{H} 7,3 gelöst). Binnen 1 Min. haben sich die Zellwände rotviolett gefärbt, später tritt die Farbe ins Plasma über, es treten z. B. nach 30 Min. im Plasmawandbelag nächst der Zellwand kleine blaue Partikelchen auf, nach 45 Min. haben diese an Größe und Menge zugenommen und finden sich über das ganze Plasma verteilt; nach 1 Stunde sind die Zellwände nur noch schwach rotviolett, nach 2–2½ Stunden farblos, dafür sind dann im Zelleninneren, schließlich auch in der Vakuole zahlreiche gefärbte Partikelchen sichtbar. Das Toluidinblau ist bei den angewandten p_{H} -Stufen zur Gänze dissoziiert. Die erste Aufnahme erfolgt nur durch Adsorption der Farbkationen, und diese findet nur in der Zellwand statt. Bei Färberversuchen Czajas mit Neutralrot werden die Zellwände

⁶ Daß auf solchem Wege nur die erste Salzaufnahme bzw. Kationenaufnahme, nicht die Salzspeicherung, welche Energieleistung von seiten des Protoplasten fordert, erklärt werden kann, und daß vollends nicht Speicherung auf Permeation, welche als freiwilliger Vorgang ein Diffusionsgefälle voraussetzt, zurückgeführt werden kann, ist heute wohl selbstverständlich. Doch wird dadurch die Nichtberücksichtigung der Ergebnisse der Permeabilitätsforschung nicht gerechtfertigt. — Wir verweisen auf Brooks (1941) Permeabilitätsmonographie.

gelbrot, und hier erscheinen schon bald nachher karminrote Partikeln im Plasma und in der Vakuole. Der Unterschied im Färbevermögen beider Farbstoffe ist bei unseren heutigen Kenntnissen leicht verständlich, da das Neutralrot in bidest. H_2O nur zum Teil in Form von Kationen, zum Teil aber in Form von permeierfähigen Farbsalzmolekülen existiert. Mit verdünnter Toluidinblaulösung in H_2O hat Czaja bei vielen anderen Objekten nur dauernde alleinige (rotviolette) Zellwandfärbung beobachtet; der Unterschied wird im Hinblick auf unsere Versuche (Höfler u. Schindler 1951, vgl. Hirn 1953) über die ungleiche Lage der Färbeschwellen verschiedener Algenzellen in der p_H -gestuften Toluidinblaureihe verständlich; das Ausbleiben des Farbübertrittes in die betreffenden Protoplaste kann auf deren geringeres Speichervermögen zurückgeführt werden.

Daß die Kationen des dissoziierten Anteils der basischen Farbstoffe in den negativ aufgeladenen Zellmembranen gespeichert werden, liegt heute völlig klar. — Wenn aber die Membranen auf solchem Weg mit Farbe überladen, die bindenden sauren Gruppen abgesättigt sind, so kann, wie es scheint, ein Teil der angereicherten Farbe zu Molekülen werden und diesen steht dann dank ihrer Lipoidlöslichkeit der Weg ins Innere des Protoplasten offen. Wie die Versuche zeigen, erfolgt die vitale Färbung der Zellsäfte erst nach einiger Zeit, viel später und langsamer als die erste elektro-adsorptive Farbanreicherung in der Membran.

Das Diffusionsgefälle der permeierfähigen Moleküle wird bei vorangegangener Farbbindung in der Membran steiler als bei bloßer Farbaufnahme aus der Lösung. So erklärt sich wohl die verstärkte Vitalfärbung der zur Membranspeicherung befähigten Arten in Farbbädern, deren p_H -Stufe so gewählt ist, daß im Bad zum Großteil Farbionen und zum geringeren Teil Farbmoleküle vorhanden sind.

Czaja (1936) hat richtig erkannt, daß die adsorptive Farbbindung in der Zellwandung der erste Schritt zur Aufnahme von Stoffen in die Zelle sein kann. Er hat aber gemeint, daß bei Verhinderung der Membranadsorption durch Salzblockierung die Farbaufnahme in die Protoplasten und damit die Vitalfärbung ganz unterbleibe. Dieser Irrtum ist in der Literatur sogleich mit Nachdruck richtiggestellt worden (Borriss 1937, S. 45, Dravert 1937 c, S. 388, 1938, S. 137, 311). Für uns liegen die Dinge heute völlig klar: Molekularer Farbstoff kann unvermindert permeieren, auch wenn dem Farbbad Neutralsalze in hoher Konzentration zugesetzt sind. Denn der lipoidlösliche Farbanteil permeiert durch das Plasma ohne Mitwirkung oder Einfluß der Membran (es sei denn, daß diese grobdispersen Farbstoffen gegenüber eine Filterwirkung ausübt). Farbstoff in ionisiertem Zustand, der an sich nicht permeierfähig ist, kann indirekt, im Sinne Czajas, auf dem Umweg über die Membranspeicherung eine verzögerte Aufnahme in den Protoplasten finden. In diesem Fall wirkt Salzzusatz blockierend und kann so, wie Czaja richtig erkannt hat, die Vitalfärbung hindern.

Die Fähigkeit zu solcher vermittelnden Farbanreicherung in den Zellwänden ist nun bei verschiedenen Zellen und, wie von uns gezeigt wurde, selbst bei den Arten der einen Algengattung *Closterium* spezifisch stark verschieden.

Literatur

- Arisz, W. H., 1946: Contribution to a theory on the absorption of salts by the plant and their transport in parenchymatous tissue. *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch. Amsterdam* 49, 420.
- 1952: Transport of organic compounds. *Ann. Review of Plant Physiology* 3, 109.
- Borriess, H., 1937: Beiträge zur Kenntnis der Wirkung von Elektrolyten auf die Färbung pflanzlicher Zellmembranen mit Thioninfarbstoffen. *Protoplasma* 28, 23.
- Brauner, L., 1933: Zur Frage der postmortalen Farbstoffaufnahme von Pflanzenzellwänden. *Flora* 127, 190.
- Brooks, S. C., and M. Moldenhauer-Brooks, 1941: The permeability of living cells. *Protoplasma-Monographien* 19, Berlin.
- Burström, H., 1949: Mineralstoffwechsel. *Fortschritte der Botanik* 12, 216.
- 1951: *Dergl. Ebenda* 13, 227.
- Cholnoky, B. v., und K. Höfler, 1950: Vergleichende Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen. *Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I*, 159, 143.
- und H. Schindler, 1951: Winterlicher Diatomeen-Aspekt des Ramsauer Torfmoores. *Verh. Zool.-Bot. Ges. Wien (Festschrift)* 92, 225.
- Czaja, A. T., 1934: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengewebe. II. Basische Farbstoffe. *Planta* 21, 531.
- 1936: Untersuchungen über den Membraneffekt des Absorptionsgewebes und über die Farbaufnahme in die lebende Zelle. *Planta* 26, 90.
- Drawert, H., 1937: Untersuchungen über den Erregungs- und den Erholungsvorgang in pflanzlichen Geweben nach elektrischer und mechanischer Reizung. *Planta* 26, 391.
- 1937 b: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. *Flora* 132, 91.
- 1937 c: Der Einfluß anorganischer Salze auf die Aufnahme und Abgabe von Farbstoffen durch die pflanzliche Zelle. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 55, 380.
- 1938: Über die Aufnahme und Speicherung von Prune pure durch die pflanzliche Zelle. *Planta* 29, 179.
- 1939: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. *Planta* 29, 376.
- Förster, Th., 1951: Fluoreszenz organischer Verbindungen. *Vandenhoeck u. Ruprecht, Göttingen*.
- Hirn, I., 1952: Vitalfärbungsstudien an Desmidiaceen und Diatomeen. *Diss. Wien*.
- 1953: Vitalfärbungsstudien an Desmidiaceen. *Flora*. Im Druck.
- Höfler, K., 1926: Über Eisengehalt und lokale Eisenspeicherung in der Zellwand der Desmidiaceen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I*, 135, 103.
- 1951: Plasmolyse mit Natriumkarbonat. Zur Frage des Plasmalemmas bei Süßwasseralgen und bei Gewebszellen von Landblütenpflanzen. *Protoplasma* 40, 426.
- und H. Schindler, 1951: Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration. *Protoplasma* 40, 137.
- — 1952: Algengallerten im Vitalfärberversuch. *Österr. Bot. Zeitschr.* 99, 529.
- und A. Stiegler, 1947: Cresylechtviolett als Vitalfarbstoff. *Mikroskopie* 2, 250.
- Irwin, M., 1927: Certain effects of salts on the penetration of brilliant cresyl blue into *Nitella*. *J. gen. Physiol.* 10, 425.
- Kinzel, H., 1955: Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. *Österr. Bot. Zeitschr.* 100, 25.

- Kopetzky-Rechtperg, O., 1931 a: Über die Kristalle in den Zellen der Gattung *Closterium* Nitzsch. Beih. Bot. Centralbl. 47, Abt. I, 291.
- 1931 b: Die „Zersetzungskörperchen“ der Desmidiaceenzelle. Arch. Protistenkunde 75, 290.
- 1949: Zellbau und Zelleinschlüsse bei Conjugaten, besonders Desmidiales. Protoplasma 39, 106.
- Krieger, W., 1933: Die Desmidiaceen Europas m. Ber. der außereuropäischen Arten. Rabenhorst Krypt-Flora, XIII, Abt. 1.
- Küster, E., 1931: Die Pflanzenzelle. II. Aufl. Jena.
- Krebs, I., 1931: Beiträge zur Kenntnis des Desmidiaceen-Protoplasten: I. Osmotische Werte. II. Plastidenkonsistenz. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 160, 579.
- Loub, W., 1931: Über die Resistenz verschiedener Algen gegen Vitalfarbstoffe. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., 160, 829.
- Lundegårdh, H., 1941: Untersuchungen über das chemisch-physikalische Verhalten der Oberfläche lebender Zellen. Protoplasma 35, 448.
- Lütkenmüller, J., 1902: Die Zellmembran der Desmidiaceen. Cohns Beitr. Biol. Pflanzen 8, 347.
- Pecksieder, M. E., 1950: Zur Frage der Farblionenpermeabilität des Protoplasmas. Biologia generalis 19, 224.
- Pekarek, J., 1938: Über die Wirkung von Nitraten auf die Färbung pflanzlicher Zellwände und Zellsäfte mit Azur I. Protoplasma 30, 161.
- Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Unters. Bot. Inst. Tübingen 2, 179.
- Prát, S., 1931: The vital staining of cell walls. Protoplasma 12, 394.
- Rehm, S., 1938: Die Wirkung von Elektrolyten auf die Aufnahme saurer und basischer Farbstoffe durch die Pflanzenzelle. Planta 28, 359.
- Wiesner, G., 1951: Untersuchungen über Vitalfärbung von *Allium*-Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. Protoplasma 40, 403.
- Wisselingh, C. van, 1912: Über die Zellwand von *Closterium*. Zeitschr. f. Bot. 4, 337.
- 1924: Die Zellmembran. Linsbauers Handbuch d. Pflanzenanatomie III/2.

Über das elektrische Potential und über den Erregungsvorgang bei dem Myxomyceten *Physarum polycephalum*

Von

Themistokles Diannelidis und Karl Umrath

Aus dem Botanischen Institut der Universität Thessaloniki und dem Zoologischen Institut der Universität Graz

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 20. November 1952)

Einleitung

Die großen, nackten Plasmamassen der Myxomyceten erscheinen zur Messung der elektrischen Spannung zwischen Protoplasma und Außenmedium besonders geeignet. Von früheren Untersuchungen ist uns folgendes bekannt: Kümme! (1929) fand in 15 Messungen eine in Plasmodien von *Badhamia utricularis* eingeführte Elektrode positiv gegenüber einer in dem umgebenden Quellwasser, die Spannung war im Mittel 2 mV. Watanabe, Kodati und Kinoshita (1939), deren japanische Arbeit wir nur aus einem Autoreferat kennen, haben an Plasmodien von *Didymium nigripes* mit eingestochenen Elektroden positive Potentiale von 0,1 bis 6,2 mV gemessen. Demgegenüber fanden Tasaki und Kamiya (1950) an zwischen zwei Elektroden ausgespannten Plasmodien von *Physarum polycephalum*, daß bei mechanischen und elektrischen Reizen an einer der Elektroden die Spannung an dieser für kurze Zeit um einige Millivolt negativ wird. Da während der Erregung die Spannung zwischen Protoplasma und Außenmedium herabgesetzt, in manchen Fällen sogar umgekehrt wird, ist nach den letztgenannten Befunden anzunehmen, daß das Protoplasma der Myxomyceten gegenüber dem Außenmedium elektrisch negativ ist.

Diese, uns unsicher und uneinheitlich vorkommenden Befunde, ließen eine neuerliche Untersuchung eines Myxomyceten wünschenswert erscheinen, zumal die bisherigen Messungen an anderen Pflanzenzellen für das Protoplasma negative Spannungen von meist ungefähr 100 mV ergeben hatten.

Methodik

Als Versuchsobjekte dienten uns Plasmodien von *Physarum polycephalum*. Diesen Myxomyceten hat das Grazer Pflanzenphysiologische Institut

von Herrn Professor W. Seifriz (Philadelphia) erhalten, und er wird hier in Petrischalen auf einem Nährmedium kultiviert, das in 100 cm³ Leitungswasser 3 g Haferflocken (Hafermark Knorr) und 1,5 g Agar enthält. Für die Überlassung von Kulturen danken wir Herrn Professor Weber und Frau Dr. Stipberger.

Die Methodik der elektrischen Messung war ähnlich, wie sie Umrath (1930, 1932 a) bei seinen Untersuchungen an *Nitella*-Zellen beschrieben hat. Wenn die elektrische Spannung am Lindemann-Elektrometer direkt abgelesen wurde, entsprachen einem Teilstrich im Meßokular 6 mV, $\frac{1}{2}$ Teilstrich konnte noch abgelesen werden. Wenn die Ausschläge photographisch registriert wurden, entsprachen 10 mV 1,25–1,45 mm. Die Ableitung der Spannung erfolgte mit Elektroden, die aus vorne fein ausgezogenen, mit 0,1 normaler KCl-Lösung gefüllten Glasröhren bestanden. Die zum Einstich in das Plasmodium bestimmte Elektrode hatte einen Spitzendurchmesser von etwa 20 μ . Die andere Elektrode mit wesentlich gröberer Spitze wurde entweder direkt mit dem Agar, auf dem sich das Plasmodium befand, in Berührung gebracht, oder sie tauchte in Leitungswasser, das auf den Agar aufgetropft war oder das mit dem Plasmodium in Berührung stand, wenn sich dieses auf einer bloßen Glasunterlage befand.

Die Beobachtung der einzustechenden Elektrode und der Strömung im Plasmodium erfolgte mit einem stereoskopischen Mikroskop nach Greenough von C. Zeiß mit Stativ XB bei 51facher Vergrößerung. Als Lichtquelle diente eine Zeiß-Mikroskopierlampe, die soweit als tunlich abgeblendet wurde, auch um die Austrocknung einzuschränken.

Gereizt haben wir mit einzelnen Öffnungsinduktionsschlägen eines Induktoriums mit Eisenkern und übereinander geschobenen Spulen. Die Reizstärke wurde entweder dadurch variiert, daß im Primärkreis ein, zwei oder vier Stahllakkumulatoren eingeschaltet wurden, oder dadurch, daß bei vier Stahllakkumulatoren Widerstände im Primärkreis eingeschaltet wurden. Die Stromzuführung erfolgte durch mit Chlorsilber überzogene Silberdrähte, die in Wassertropfen tauchten oder in den Agarnährboden eingestochen waren. Bei den Versuchen über die elektrische Erregbarkeit haben wir als Stromquelle Stahllakkumulatoren in verschiedener Anzahl verwendet. Bei einer Entfernung zwischen den Reizelektroden von 1 cm ergaben zehn Akkumulatoren, also etwa 12 Volt, den schwächsten noch wirksamen Reiz. Längere Reizeiten wurden durch einen mit der Hand betätigten Stromschlüssel hergestellt, für Reizeiten unter 0,3 s stand ein modifiziertes Lucaspendel zur Verfügung.

Das elektrische Potential des Protoplasmas

Auch wir haben in der ersten Zeit an Plasmasträngen nur sehr kleine Spannungen von wenigen Millivolt gemessen. Erst als wir die feine Elektrode in größere Plasmamassen einstachen, beobachteten wir Spannungen von etwa 40 mV, wobei das Plasma negativ gegenüber dem umgebenden Agar war. Diese Spannungen gingen meist im Laufe einiger Minuten stark zurück. Durch ein tieferes Einstechen oder sonst eine Bewegung der Elek-

trodenspitze im Plasma konnte die ursprüngliche hohe Spannung für kurze Zeit wiedererhalten werden. Diese Beobachtungen erinnern an ähnliche Befunde von Umrath an *Nitella* (1930, 1932 a) und an anderen Pflanzenzellen (1934 b), die ihn zu der Annahme einer Membranbildung an der Elektrodenspitze führten. Diese Membran würde, wenn sie die Elektrodenspitze umwächst und die Plasmahautschichte erreicht, eine Abkapselung der Elektrode bedingen und sie elektrisch vom Plasma isolieren. Tatsächlich verhalten sich solche Elektroden fast so, als ob sie über einen großen Widerstand mit dem Außenmedium verbunden wären.

Der beste Beweis für die Bildung einer selektiv ionenpermeablen Membran an der Elektrodenspitze erscheint uns durch folgende Beobachtung gegeben, die Umrath (1932 a) bei seinen Untersuchungen an *Nitella* gemacht hat und die wir bei *Physarum* wiederholen konnten. Eine oft bei Messungen in das Protoplasma eingestochen gewesene Elektrode zeigt, wenn zunächst anhaftende Plasmareste weggelöst sind, in Wasser und in geringerem Grade in verdünnten Salzlösungen ein stark negatives Potential gegenüber einer nicht eingestochen gewesenen Elektrode, während die Elektroden in 0,1 normaler KCl-Lösung, die sich auch in ihrem Inneren befindet, keine Potentialdifferenz gegeneinander haben.

Wir fanden dann weiter, daß unsere ersten Mißerfolge an Plasmasträngen im Agarnährmedium damit zusammenhingen, daß sich diese Plasmastränge unter der Agaroberfläche befanden, daß sie von der Elektrode leicht eingedrückt wurden oder ihr auswichen und daß, wenn der Einstich schon glückte, die Elektrodenspitze leicht auf der Unterseite den Plasmastrang nochmals durchbohrte und so wieder in den Agar geriet.

Als wir diese Erfahrungen hatten, fiel es uns verhältnismäßig leicht, die elektrische Spannung des Protoplasmas gegenüber dem Außenmedium zu messen. Von unseren weit über 200 Messungen haben wir Gruppen nach den Gesichtspunkten herausgegriffen, ob sich das Plasmodium auf dem Agarnährboden befand oder auf Glas, wenn es auf den Deckel der Petrischale gekrochen war, und in beiden Fällen weiter, ob es sich um Plasmastränge, größere Plasmamassen oder weit ausgebreitete, kriechende Plasmamassen handelte. Wir geben im folgenden die Mittelwerte der gemessenen Spannungen, ihre mittleren Fehler und in Klammern die Extremwerte an. Auf Agar ergaben 3 Plasmastränge $-30,0 \pm 6,0$ (-42 , -24) mV, 13 Plasmamassen, die mitunter kugelig und glänzend, mitunter mehr oder weniger zerklüftet waren, $-37,4 \pm 2,8$ (-60 , -24) mV, 16 zerklüftete Plasmamassen, von denen auch die Abb. 2, 3 und 4 stammen, ergaben $-34,0 \pm 1,6$ (-48 , -22) mV; an weitausgebreiteten, kriechenden Plasmamassen ergaben 7 Messungen an Frontteilen $-26,6 \pm 2,9$ (-36 , -18) mV, 8 Messungen hinten $-25,5 \pm 1,9$ (-36 , -18) mV. Bei den Messungen auf dem Glas der Petrischalendeckel wurde neben dem Plasmodium, in Berührung mit ihm, ein Wassertropfen aufgebracht, in den die Spitze der weiten Elektrode getaucht wurde, während die feine Elektrode in einiger Entfernung in das Plasmodium eingestochen wurde. 3 Messungen an Plasmasträngen ergaben $-36,0 \pm 3,5$ (-42 , -30) mV, 9 Messungen an ruhenden Plasmamassen $-36,7 \pm 5,2$ (-66 , -18) mV; an den weit ausgebreiteten,

kriechenden Plasmamassen ergaben 20 Messungen an Frontteilen $-68,9 \pm 4,5$ ($-108, -30$) mV und 13 Messungen an den hintersten Teilen, die noch auf den Deckel der Petrischale gekrochen waren, $-69,7 \pm 6,2$ ($-102, -36$) mV.

Alle diese Angaben beziehen sich auf den Beginn der Messungen, und die Spannung fiel in den meisten Fällen bald auf einen niedrigen Wert von etwa -12 mV. Es gab aber auch Fälle, in denen die zuerst gemessene Spannung durch längere Zeit erhalten blieb, in Plasmasträngen bis 10 Minuten lang, in ruhenden Plasmamassen bis 15 Minuten und in ausgebreiteten, kriechenden Plasmamassen bis 45 Minuten. Wahrscheinlich dauerte in den Plasmamassen die Abkapselung der eingestochenen Elektrodenspitze durch eine um sie herum gebildete Membran deswegen oft länger, weil man tiefer in sie einstechen konnte als in die Plasmastränge. Die kriechenden Plasmamassen scheinen, vielleicht in Zusammenhang mit ihrer Bewegung, weniger zur raschen Membranbildung befähigt zu sein als die ruhenden.

Der Aktionsstrom

Die ersten Spannungsmessungen haben wir bei direkter Ablesung des Lindemann-Elektrometers gemacht, und hiebei haben wir auch die ersten Aktionsstrombeobachtungen angestellt. Unsere Aufzeichnungen über das Ausmaß der Aktionsströme und über ihren zeitlichen Verlauf stimmen mit dem überein, was die späteren photographischen Registrierungen gezeigt haben.

Das Auffälligste an den Aktionsströmen ist ihr zeitlicher Verlauf, insofern als der Anstieg des Aktionsstroms, also der Rückgang des Protoplasmapotentials, verhältnismäßig rasch erfolgt im Vergleich zu dem sehr langsamen Abfall des Aktionsstroms, also zur Wiederherstellung des Protoplasmapotentials. Abb. 1 zeigt diese Verhältnisse an zwei bei langsamem Gang des photographischen Papiers aufgenommenen Aktionsströmen. Abb. 2 und 3 zeigen dasselbe an zwei bei rascherem Gang aufgenommenen Aktionsströmen, wobei die Aufnahmen die abfallenden Teile der Aktionsströme nicht mehr zur Gänze enthalten. Abb. 4 zeigt zwei Aktionsströme mit der kürzesten Gesamtdauer, die wir überhaupt beobachtet haben, aber auch bei ihnen ist, verglichen mit den sonst bekannten Objekten, der Anstieg noch sehr steil im Verhältnis zu dem sehr flachen Abfall. Nach 13 Aufnahmen bei raschem Gang ist die Anstiegszeit des Aktionsstroms $0,6 \pm 0,1$ (1,0, 0,3) s, nach 15 Aufnahmen bei langsamerem Gang des photographischen Papiers ist seine Gesamtdauer $36,4 \pm 4,7$ (66, 5) s.

Weiter ist bemerkenswert, daß der Aktionsstrom bei *Physarum* die elektrische Spannung zwischen Protoplasma und Außenmedium meist nur etwa zur Hälfte rückgängig macht, obwohl Ähnliches auch von manchen



Abb. 1. Zwei Aktionsstromaufnahmen von Plasmodien von *Physarum polycephalum*. Jedesmal oben, gestrichelt Nullstellung des Elektrometers, in der Mitte Potential des Protoplasmas gegenüber dem Außenmedium mit einem durch einen Öffnungsinduktionsschlag ausgelösten Aktionsstrom; unten Zeitmarken 10 s.

anderen Pflanzenzellen bekannt ist. An Plasmasträngen haben wir bei zwei Beobachtungen Plasmapotentiale von 48 und 24 mV notiert und Aktionsströme von 18 und 6 mV. Diese Aktionsströme haben also 38 bzw. 25% der Spannung zwischen Protoplasma und Außenmedium vorübergehend rück-

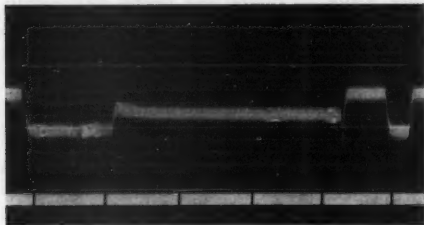


Abb. 2. Plasmodium von *Physarum polycephalum*; zuerst Nullstellung des Elektrometers, dann Potential des Protoplasmas gegenüber dem Agarnährboden mit einem durch einen Öffnungsinduktionsschlag ausgelösten Aktionsstrom, zu Ende Nullstellung des Elektrometers mit einer Eichkurve von -50 mV. Unten Zeitmarken 10 s.

gängig gemacht. An Plasmamassen, meist auf Glas, haben wir 22 solche Beobachtungen; sie ergaben als Protoplasmapotential $-43,1 \pm 2,7$ (-66 , -24) mV, als Aktionsstrom $20,8 \pm 2,3$ (57, 9) mV oder $49,2 \pm 3,9$ (75, 19) % des Protoplasmapotentials. 27 Aktionsströme, ebenfalls meist von Plasmamassen auf Glas, haben wir, wie in Abb. 1, bei langsamem Gang des photographischen Papiers registriert; es ergab sich dabei für das Protoplasmapotential $-43,7 \pm 2,3$ (-69 , -25) mV, für den Aktionsstrom $22,1 \pm 1,5$ (37, 9) mV oder $51,0 \pm 3,5$ (84, 20) % des Protoplasmapotentials. Schließlich haben wir 16 Aktionsströme an zerklüfteten Plasmamassen auf Agar bei raschem Gang, wie in Abb. 2—4, registriert. Es ergab sich hier für das Protoplasmapotential $-34,0 \pm 1,6$ (-48 , -22) mV, für den Aktionsstrom $19,7 \pm 1,6$ (31, 8) mV oder $57,4 \pm 3,5$ (84, 46) % des Protoplasmapotentials. Der Vergleich dieser Zahlen deutet darauf hin, daß bei einem größeren Potential zwischen Protoplasma und Außenmedium, wie es bei den Plasmamassen auf Glas der Fall ist, der Aktionsstrom im Mittel kaum größer ist als bei kleinerem Protoplasmapotential, wodurch er prozentual kleiner erscheint. Dasselbe zeigt auch ein Vergleich der Einzelwerte besonders innerhalb der beiden ersten hier angeführten Versuchsgruppen.

Da, wie erwähnt, das wahre elektrische Potential des Protoplasmas meist nur über kurze Zeit zu messen war, war es schwer, mehrere Aktionsstrombeobachtungen nacheinander bei verschiedener Reizstärke unter gut vergleichbaren Bedingungen auszuführen. In drei Fällen, in denen wir glauben, daß uns das gelungen ist, waren Größe und Dauer der Aktionsströme

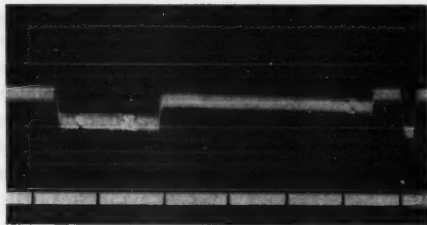


Abb. 5.

Wie Abb. 2, von einem anderen Plasmodium.

von der Reizstärke nahezu unabhängig, wobei diese von der eben wirksamen bis zur vierfachen Stärke variiert wurde. Abb. 4 zeigt zwei solche Aktionsströme bei einem Verhältnis der Reizstärken wie 1 zu 2. In zwei Fällen nahm das Ausmaß des Aktionsstroms mit der Reizstärke deutlich zu.

Veränderungen der Protoplasmaströmung bei der Erregung

Bei denselben Reizen durch Öffnungsinduktionsströme, bei denen wir die Aktionsströme untersucht haben, haben wir auch die Wirkung auf die Protoplasmaströmung beobachtet. Bekanntlich ändert sich in den strömenden Streifen innerhalb größerer Massen und in den Plasmasträngen der Myxomyceten die Strömungsrichtung rhythmisch. Bei unseren Kulturen trat der

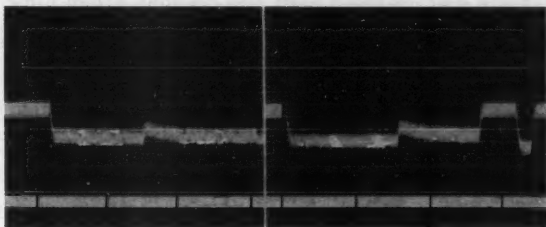


Abb. 4. Plasmodium von *Physarum polycephalum*; zuerst Nullstellung des Elektrometers, dann Potential des Protoplasmas gegenüber dem Agarnährboden mit Aktionsstrom, ausgelöst durch einen Öffnungsinduktionsschlag mit Reizstärke 1; nach einer Pause von etwa einer Minute wieder erst Nullstellung des Elektrometers, dann Potential des Protoplasmas mit Aktionsstrom ausgelöst durch einen Öffnungsinduktionsschlag von der Reizstärke 2, schließlich Nullstellung des Elektrometers mit einer Eichkurve von -50 mV; unten Zeitmarken 10 s.

Richtungswechsel meistens alle 60–90 s ein, der damit verbundene Stillstand war meist nicht länger als eine Sekunde, selten bis 6 s. Um einen Reizeffekt sicher als solchen zu erkennen, wurde das normale Verhalten des Plasmodiums durch einige Zeit beobachtet, und dann wurde bald nach einem Richtungswechsel der Strömung gereizt.

Unter einer gewissen Reizstärke trat kein Effekt ein. Über dieser Reizstärke, welche ungefähr dieselbe war, die auch Aktionsströme auslöste, trat nach einer Latenzzeit bis zu 20 s eine Veränderung der Strömung ein, die in folgendem bestehen konnte. Entweder wurde die Strömungsrichtung ohne Stillstand gewechselt oder es trat nach einem Stillstand von Bruchteilen einer Sekunde bis zu 45 s eine neuerliche Strömung in der alten Richtung oder in der Gegenrichtung ein, wobei die Strömungsgeschwindigkeit ungefähr den alten Wert hatte. Dickere Plasmastränge haben erst bei etwas stärkeren Reizen reagiert als die dünneren. Stärkere Reize haben die Latenzzeit zwischen Reiz und Beginn der Reaktion verkürzt, sonst war bei einer Vervielfachung der Reizstärke kein wesentlicher Einfluß auf die Reaktion zu bemerken. Bei den Reizen mit Gleichstrom waren Schädigungen oft, ins-

besondere nach wiederholten und längerdauernden Reizen zu beobachten. Die ersten Anzeichen einer Schädigung waren sehr lange Stillstände, nach denen die Strömung erst nach auffallend langer Zeit oder überhaupt nicht mehr in der alten Art in Gang kam. Diese Zustände dürften es sein, in denen Seifriz (1950) Viskositätszunahmen nach elektrischen Reizen beobachtet hat. Die ersten morphologisch kenntlichen Zeichen einer Schädigung waren einzelne helle Streifen in der Längsrichtung der Stränge, denen ein Zerfall des Protoplasmas folgte.

Die elektrische Erregbarkeit

Wir haben versucht, für verschiedene Spannungen die für die Auslösung des Strömungsstillstandes notwendigen Reizzeiten zu bestimmen. Dies war dadurch sehr erschwert, daß, wie erwähnt, öftere Einwirkung von Gleichstrom, besonders bei längeren Reizzeiten, leicht zu Schädigungen führt. Wir können als Gesamtergebnis aus zahlreichen Beobachtungen an vielen Plasmodien nur folgendes sagen. Eine Verlängerung der Reizzeit über 3 s erhöht die Reizwirkung nicht mehr. Bei Verkürzung der Reizzeit auf 1 s muß die Spannung nur wenig gesteigert werden, bei Verkürzung auf 0,3 und weiter auf 0,1 s ist eine weitere Steigerung der Spannung zur Auslösung desselben Strömungsstillstandes notwendig. Eine Verdoppelung der Reizspannung scheint ungefähr bei einer Reizzeit von 0,2 s notwendig zu sein. Die Chronaxie wäre also ungefähr 0,2 s.

Schlußbetrachtungen

Wir haben zwischen dem Protoplasma von *Physarum polycephalum* und dem Außenmedium eine Spannung von der Größenordnung von 30 mV gemessen, wobei das Protoplasma negativ war. Die geringen positiven Werte von 2 mV, die Kümmel (1929) an *Badhamia*, und von 0,1 bis 6,2 mV, die später Watanabe, Kodati und Kinoshita (1939) an *Didymium nigripes* gemessen haben, dürften nach unseren Beobachtungen über die Membranbildung an in das Protoplasma eingestochenen Elektroden daher rühren, daß diese Autoren entweder erst nach einer Abkapselung der Elektroden spitze durch eine vom Protoplasma gebildete Membran gemessen haben oder daß vielleicht eine vom Protoplasma beschmutzte Elektroden spitze durch das Protoplasma hindurchgestochen worden war. Auch wir haben in manchen Fällen erst dadurch, daß keine größere Spannung zu messen war, festgestellt, daß sich die Elektroden spitze außerhalb des Protoplasmas befand.

Watanabe, Kodati und Kinoshita (1937) haben bei ihren Messungen an *Didymium* Schwankungen des elektrischen Potentials beobachtet, die den rhythmischen Änderungen in der Richtung der Protoplasmaströmung vorangingen. Hingegen haben Kamiya und Abe (1950) bei *Physarum polycephalum* elektrische Veränderungen gefunden, die den Änderungen der Strömungsrichtung folgen und von denen sie glauben, daß sie weder Ursache noch Folge von Änderungen der Protoplasmaströmung sind. Wir haben bei den viel größeren und sicher ganz anders-

artigen Potentialen, die wir gemessen haben, keine Schwankungen im Rhythmus des Wechsels in der Strömungsrichtung gefunden. Allerdings handelte es sich bei Kamiya und Abe um einen zwischen den Elektroden in Luft, also elektrisch isoliert, ausgespannten Plasmastrang, zwischen dessen Enden sich leicht Potentialdifferenzen ausbilden konnten, bei uns befand sich das Plasmodium auf dem gut leitenden Nährboden oder auf einer mehr oder weniger feuchten Glasunterlage, so daß Potentialdifferenzen zwischen verschiedenen Stellen des Plasmodiums Ströme im Plasmodium und im Außenmedium erzeugt hätten, die ihrerseits die Potentialdifferenzen herabgesetzt hätten.

Wir haben auch keine Unterschiede in der Spannung am hinteren und am vorderen Teil kriechender Plasmamassen gefunden, während Watanabe, Kodati und Kinoshita (1937, 1939) an *Didymium* die Front des Plasmodiums positiv gegenüber den hinteren Teilen fanden.

Die Spannung zwischen Protoplasma und Außenmedium wird vielfach als Potential an einer selektiv ionenpermeablen Membran aufgefaßt, von der man vor allem annimmt, daß sie für Kationen viel durchlässiger ist als für Anionen. Es ist auch bekannt, daß man das Potential an der Zellgrenzfläche lokal durch Aufbringen einer Kaliumchloridlösung entsprechender Konzentration aufheben kann. So fanden auch wir, daß nach Aufbringen von einem Tropfen 0,1 normaler KCl-Lösung auf eine Plasmamasse von *Physarum polycephalum* eine in diesen Tropfen eingetauchte Elektrode gegen eine zweite im Agarnährboden eine negative elektrische Spannung annimmt, die derjenigen ganz ähnlich ist, die man beim Einstich in das Plasmodium messen kann.

Nach der eben dargelegten Auffassung des Potentials zwischen Protoplasma und Außenmedium als Potential an einer selektiv kationenpermeablen Membran, die vor allem für Kaliumionen permeabel ist, ist zu erwarten, daß das Potential an denjenigen Zellen groß ist, deren Salzgehalt und damit Kationengehalt und vor allem deren Kaliumgehalt groß ist. Wir haben leider keine Angaben über den Kationengehalt von Myxomyceten-Plasmodien gefunden, aber es ist anzunehmen, daß ein nacktes Protoplasma in einem Medium von geringem osmotischem Wert auch in seinem Inneren einen geringeren Salzgehalt hat als eine Pflanzenzelle mit Zellulosemembran, deren Turgorspannung dem osmotischen Druck im Zellinneren das Gleichgewicht hält, oder als eine Zelle in Meerwasser oder als eine tierische Zelle, die von einer Gewebsflüssigkeit mit einem gewissen Salzgehalt umgeben ist. Die tatsächlich gemessenen Potentiale entsprechen durchaus dieser Erwartung. An Pflanzenzellen mit Zellulosemembran in Süßwasser wurden meist Protoplasmapotentiale von -100 bis -150 mV gemessen; an Epidermiszellen von *Helodea*-Blättern -104 mV (Umrath 1934 b), an Zellen der Außenwand der *Utricularia*-Blasen -59 , an denen der Innenwand -132 mV (Diannelidis 1948), an Internodialzellen von *Nitella mucronata* etwa -150 mV (Umrath 1934 a), an denen von *Nitella opaca* -105 mV (Umrath 1953), an *Spirogyra*-Zellen -103 mV, an *Vaucheria* -87 mV (Umrath 1934 b). An *Valonia meroophylla*, einer Pflanzenzelle in Meerwasser, wurde von Umrath (1938) ein Protoplasma-

potential von nur -20 bis -50 mV gemessen. Die Protoplasmapotentiale tierischer Nerven- und Muskelfasern liegen zwischen -50 und -95 mV. Bei *Physarum polycephalum* haben wir an ruhenden Plasmamassen und an Plasmasträngen Protoplasmapotentiale von etwa -37 mV gemessen, wobei es keinen Unterschied ausmachte, ob sich das Plasmodium auf dem Agarnährboden oder auf einer Glasunterlage befand. Bei den weit ausgebreiteten, kriechenden Plasmamassen scheint das Außenmedium von Einfluß auf das Protoplasmapotential zu sein, denn auf Agarnährboden fanden wir etwa 26 mV, auf Glasunterlage 69 mV. Vielleicht ist das aktivere Protoplasma in seinem osmotischen Wert und in seinem Ionengehalt weniger unabhängig von der Umgebung und hat bei niedrigerem osmotischem Wert im Außenmedium, wie er im Agarnährboden gegeben ist, auch einen höheren Wassergehalt und niedrigeren Salzgehalt im Inneren und vielleicht verliert es an Wassergehalt, wenn es aus dem Nährmedium heraus auf die trockene Unterlage des Petrischalendeckels kriecht.

Tasaki und Kamiya (1950) haben an einem zwischen den Elektroden gespannten Plasmastrang von *Physarum polycephalum*, bei mechanischen und elektrischen Reizen an einer der Elektroden, an dieser eine vorübergehende Negativierung gefunden, die sie als lokales Potential deuten. Bei Objekten mit gut ausgebildeter Erregungsleitung unterscheidet sich das lokale Potential vom Aktionsstrom folgendermaßen. Der Aktionsstrom wird durch alle Reize, die ihn überhaupt auslösen, in gleicher Größe ausgelöst und pflanzt sich durch Erregungsleitung weiter fort. Reize, die etwas zu schwach sind, um einen Erregungsvorgang mit Aktionsstrom auszulösen, bedingen nur eine lokale Erregung mit einem lokalen Potential. Das lokale Potential ist in seinem Ausmaß von der Reizstärke abhängig und breitet sich nur über wenige Millimeter aus, wobei seine Größe stetig abnimmt. Die ersten lokalen Potentiale wurden übrigens von Umrath (1952b) an *Nitella* beschrieben und damals als Latenzvorgang bezeichnet, weil sie bei wenig überschwelligem Reizen die Latenzzeit zwischen Reiz und Aktionsstrom ausfüllen.

Es ist anzunehmen, daß die von uns an *Physarum polycephalum* beobachteten Aktionsströme und die oben beschriebenen Veränderungen der Strömung Begleiterscheinungen desselben Erregungsvorgangs sind, so daß man die Erregungsleitung auch nach der Ausbreitung der Strömungsveränderung beurteilen kann. Danach würde ein Erregungsübergang von dünnen auf wesentlich dickere Plasmastränge oft nicht stattfinden, denn, wie erwähnt, bedingen schwache elektrische Reize oft Strömungsreaktionen in dünnen Plasmasträngen ohne daß die Strömung in benachbarten, wesentlich dickeren Plasmasträngen betroffen wird. Wir glauben aber doch, daß eine gewisse Erregungsleitung vorhanden ist. In einigen Fällen haben wir Plasmastränge in der Umgebung einer Reizelektrode beobachtet und auch bei den geringsten überhaupt wirksamen Reizstärken in dem Gebiet außerhalb der Reizelektroden dieselben Strömungsreaktionen beobachtet, wie in dem Gebiet zwischen ihnen. Mitunter wurde bei einer Steigerung der Reizstärke ein besonders schwacher Plasmastrang so geschädigt, daß er abstarb. Es kam in solchen Fällen vor, daß benachbarte, stärkere Plasmastränge, die

vorher auf die Reize mit Strömungsveränderungen reagiert hatten, das jetzt nicht mehr taten. Es liegt nahe anzunehmen, daß sie selbst eine höhere Reizschwelle hatten und vorher von dem dünnen Strang aus erregt worden sind. Wir möchten daher die von uns nach Reizen beobachteten Potentialänderungen Aktionsströme, die von Tasaki und Kamiya beobachteten lokale Potentiale nennen. In beiden Fällen fällt gegenüber allen bisherigen Befunden an anderen Objekten der sehr steile Anstieg und der sehr flache Abfall der Potentialänderung auf. Aus Fig. 2 bei Tasaki und Kamiya (1950) kann man eine Anstiegszeit von 0,2 bis 0,25 s und eine Gesamtdauer von etwa 4 s ablesen. Das entspricht etwa den kürzesten von uns beobachteten Werten, 0,3 s für die Anstiegszeit, 5 s für die Gesamtdauer. Die von Tasaki und Kamiya beobachteten Potentialänderungen waren, wie das für lokale Potentiale bekannt ist, in ihrer Größe von der Reizstärke stark abhängig, die von ihnen abgebildeten haben ein Ausmaß von etwa 5 mV. In den wenigen Fällen, in denen wir eine deutliche Abhängigkeit im Ausmaß der Potentialänderung von der Reizstärke fanden, sind wohl die nach den schwächeren Reizen auftretenden als lokale Potentiale zu bezeichnen. Sie waren auch von etwas kürzerer Dauer und dürften somit weitgehend den von Tasaki und Kamiya beobachteten entsprechen. Die sonst von uns beobachteten Potentialänderungen waren von der Reizstärke kaum abhängig, was für ihre Auffassung als Aktionsströme spricht. Daß mit dem größeren Ausmaß der Aktionsströme, etwa 21 mV, eine längere Dauer, im Mittel 36 s, verbunden ist, macht uns den Eindruck eines primitiven Verhaltens. Der Rückgang des Aktionsstroms ist ja nichts anderes als der Wiederaufbau des Potentials zwischen Protoplasma und Außenmedium. Bei anderen Objekten, auch bei Internodialzellen von *Nitella mucronata*, haben lokale Potentiale und Aktionsströme nahezu denselben zeitlichen Verlauf.

Das Ausmaß des Aktionsstroms im Verhältnis zum Protoplasmapotential ist mit 50–70% gering; nur bei wenigen Pflanzenzellen, bei *Spirogyra* (Umrath 1934 b) und bei *Nitella opaca* (Umrath 1953), wurden bisher prozentual ähnlich niedrige Werte gefunden.

Der Einfluß der Reize auf die Protoplasmaströmung von *Physarum* ist nicht so auffällig wie der Strömungsstillstand der Characeen oder der Zellen der *Tradescantia*-Staubfadenhaare. Unsere Beobachtungen zeigen aber, daß der Erregungsvorgang mit in den verschiedenen Fällen etwas verschiedenen Veränderungen in der Protoplasmaströmung verbunden ist, wie wir sie oben näher beschrieben haben. Daß Tasaki und Kamiya keine solchen Veränderungen beobachtet haben, mag, wie sie selbst vermuten, darauf beruhen, daß ihre Reizeffekte sehr lokal waren, es kann seinen Grund aber auch darin haben, daß sie einen momentanen Stillstand erwarteten, während nach unseren Beobachtungen die Strömung oft erst nach etwa 20 Sekunden beeinflusst wird und dann nicht immer im Sinne eines längeren Stillstandes.

Bei unseren elektrischen Reizversuchen haben wir eine Chronaxie von 0,2 s geschätzt, die also etwas kürzer war als die Anstiegszeit des Aktionsstroms, die im Mittel 0,6 s betrug. Dieses Verhältnis der beiden Zeiten

zueinander entspricht ungefähr auch dem von anderen Objekten her bekannten. Weshalb Tasaki und Kamiya eine sehr viel kürzere Chronaxie von nur etwa 0,001 s gefunden haben, wissen wir nicht; sie selbst wundern sich über das Mißverhältnis dieses Wertes im Vergleich zur Dauer des Aktionsstroms.

Unsere Beobachtungen über die mit der Erregung verbundenen Veränderungen der Protoplasmaströmung sprechen insofern gegen eine Viskositätszunahme bei der Erregung, als mitunter nur ein Richtungswechsel ohne einen Stillstand von merklicher Dauer zu beobachten war. In anderen Fällen traten allerdings mehr oder weniger lange Strömungsstillstände auf, und diese werden vielfach durch Viskositätszunahmen erklärt. Da aber über die treibende Kraft der Strömung hier wie an anderen Objekten nichts Sicheres bekannt ist, kann man für den Strömungsstillstand ebensogut, wenn nicht besser, eine Abnahme der treibenden Kraft annehmen.

Die Strömungsstillstände, die Seifriz (1950) bei elektrischen Reizen beobachtet hat und bei denen er eine Viskositätszunahme feststellte, entsprechen nicht den Reaktionen, die wir bei solchen Reizen fanden, die schon Aktionsströme auslösen. Sie treten erst bei stärkeren Reizen auf, die bei wiederholter Anwendung bald zu sichtbaren Schädigungen führen.

Zusammenfassung

Das Protoplasma von *Physarum polycephalum* hat gegenüber dem Außenmedium ein negatives Potential. Plasmastränge und ruhende Plasmamassen haben etwa -37 mV, kriechende Plasmamassen auf Agarnährboden etwa -26 mV, dieselben auf Glas etwa -69 mV.

Die Aktionsströme haben ein Ausmaß von etwa 21 mV, eine Gesamtdauer von etwa 36 s und eine demgegenüber auffallend kurze Anstiegszeit von etwa 0,6 s.

Mit dem Erregungsvorgang sind Veränderungen der Protoplasmaströmung verbunden, die mit einer Latenzzeit bis zu 20 s nach dem Reiz auftreten und in einer Umkehr der Protoplasmaströmung oder in einem Stillstand bis zu 45 s mit Wiederaufnahme der Strömung in derselben oder in der entgegengesetzten Richtung bestehen.

Literatur

- Diannelidis, Th., 1948: Beitrag zur Elektrophysiologie pflanzlicher Drüsen. *Phyton* 1, 7—23.
- Kamiya, N., and Sh. Abe, 1950: Bioelectric phenomena in the myxomycete plasmodium and their relation to protoplasmic flow. *J. Colloid. Sci.* 5, 149—163.
- Kümmel, K., 1929: Elektrische Potentialdifferenzen an Pflanzen. *Planta* 9, 564—630.
- Seifriz, W., 1950: The effects of various anesthetic agents on protoplasm. *Anesthesiology* 11, 24—32.
- Tasaki, I., and N. Kamiya, 1950: Electrical response of a slime mold to mechanical and electrical stimuli. *Protoplasma* 39, 333—343.
- Umrath, K., 1930: Potentialmessungen an *Nitella mucronata* mit besonderer Berücksichtigung der Erregungserscheinungen. *Protoplasma* 9, 576—597.

- Umrath, K., 1932 a: Die Bildung von Plasmalemma (Plasmahaut) bei *Nitella mucronata*. Protoplasma 16, 173—188.
- 1932 b: Der Erregungsvorgang bei *Nitella mucronata*. Protoplasma 17, 258—300.
- 1934 a: Der Einfluß der Temperatur auf das elektrische Potential, den Aktionsstrom und die Protoplasmaströmung bei *Nitella mucronata*. Protoplasma 21, 329—334.
- 1934 b: Über den Erregungsvorgang bei *Spirogyra* und *Vaucheria* und über Potentialmessungen an Pflanzenzellen. Protoplasma 22, 193—202.
- 1938: Über das elektrische Potential und über Aktionsströme von *Valonia macrophysa*. Protoplasma 31, 184—193.
- 1953: Über Aktionsstrom und Stillstand der Protoplasmaströmung bei *Nitella opaca*. Protoplasma, im Druck.
- Watanabe, A., Kodati und S. Kinoshita, 1937: Über die Beziehung zwischen der Protoplasmaströmung und den elektrischen Potentialveränderungen bei Myxomyceten. Botanic. Mag. 51, 337—348, japanisch u. deutsch. Zusammenfassung 348—349. Zitiert nach Ber. wiss. Biol. 44, 132.
- — 1939: Über die Potentialdifferenzen zwischen den Myxomyceten-Plasmoiden und den Außenmedien. Botanic. Mag. 53, 410—414, japanisch. Zitiert nach einem Autorreferat in Ber. wiss. Biol. 53, 418.

Das Anthoorphin der Kompositen-Involukralblätter fehlt ihren Schließzellen

Von

Brigitte Schittengruber

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 1 Textabbildung

(Eingelangt am 12. Dezember 1952)

Möbius (1927) führt eine Reihe von Kompositen an, bei denen sich in den Epidermiszellen der Involukralblätter ein eigenartiger schwarzbrauner Farbstoff findet. Der Farbstoff ist im Zellsaft lokalisiert, mit dem ebenfalls braunschwarzen Blütenfarbstoff Anthophaein (Möbius 1900) ist er nicht identisch. Zur Unterscheidung von Anthophaein sei der Kompositen-Farbstoff Anthoorphin ($\delta\phi\phi\nu\sigma$ = graubraun) genannt. Die chemische Natur des Anthoorphins ist nicht näher bekannt. Möbius vermutet auf Grund seiner Beobachtungen an *Centaurea Scabiosa*, daß der Farbstoff dem Anthozyan nahesteht. Dafür scheint zu sprechen, daß in den Epidermiszellen der Involukralblätter junger Blütenköpfe der Zellsaft durch Anthozyan rot gefärbt ist. Die Umwandlung von Rot in Braunschwarz geht sehr rasch vor sich, Möbius meint, diese Umfärbung erfolgt unter dem Einfluß der oxydierenden Wirkung der Luft.

Wenn Anthozyan die Färbung von Epidermiszellen bedingt, so fehlt dieser Farbstoff in der Regel den Schließzellen. Falls das Anthoorphin dem Anthozyan tatsächlich nahestehen sollte, dürfte man erwarten, daß auch der graubraune Farbstoff den Schließzellen fehlt. Schon Möbius ist es aufgefallen, daß an den schwärzlichen Stellen der Involukralblätter von *Zinnia elegans* die Schließzellen frei von dem dunklen Farbstoff sind. Es sollte nun untersucht werden, ob dies bei den Stomazellen der braunschwarzen Involukralblätter auch anderer Kompositen der Fall ist.

Abgesehen von den bei Möbius angeführten Pflanzen fand sich das Anthoorphin in den Involukralblättern folgender Kompositen: *Leontodon incanus*, *L. hispidus*, *Bellis perennis*, *Crepis biennis*, *Hieracium alpinum*, *H. murorum*, *Taraxacum officinale*. Bei *Sonchus oleraceus* zeigt der Blatt-
rand älterer Involukralblätter die typische schwärzliche Färbung, in den Zellen jüngerer Blätter ist Anthozyan vorhanden. Nicht zu sehen war das Anthoorphin in den Involukralblättern von *Scorconera rosea*, *Senecio capitatus*, *Chrysanthemum corymbosum*, *Matricaria Chamomilla*, An-

themis arabica, *Centaurea bella*, *Tussilago farfara*, *Solidago-Apten* und *Doronicum plantagineum*. Es folgen nun Angaben über das Verhalten der Schließzellen in den anthoorphinhaltigen Epidermen.

Leontodon incanus: In den Involukralblättern dieser Pflanze ist das Anthoorphin in den gewöhnlichen Epidermiszellen entweder in ballenartigen Anhäufungen vorhanden oder es färbt die ganze Zentralvakuole gleichmäßig. Besonders intensiv ist die Färbung in der Mittelrippe, die auch mit tiefschwarzen Haaren besetzt ist. Der Zellsaft der Schließzellen der zahlreichen Stomata ist stets farbstofffrei.

Leontodon hispidus: Der graue Farbstoff der Hüllblätter tritt im Zellsaft niemals geballt oder granuliert auf, färbt vielmehr die Vakuole der gewöhnlichen Epidermiszellen immer gleichmäßig, allerdings in verschiedenen Zellen mit ungleicher Stärke, die Zellen der äußeren Involukralblätter sind stets wesentlich dunkler, intensiver gefärbt. Die Schließzellen erscheinen farblos.

Bellis perennis: Der „schwarze“ Farbstoff kommt vornehmlich in den Zellen des Randes und der Basis der Hüllblätter vor und tingiert die ganze Vakuole gleichmäßig. Die „weißen“ Schließzellen heben sich durch ihren farblosen Zellsaft deutlich von den grauschwarzen gewöhnlichen Epidermiszellen ab. Ganz selten kommt es vor, daß auch gewöhnliche Oberhautzellen, die an die Schließzellen angrenzen, anthoorphinfrei sind.

Hieracium alpinum: Die Involukralblätter sind ebenso wie bei *Hieracium murorum* mit Drüsenhaaren dicht besetzt; die Basiszellen und Stielzellen dieser Haare sind durch den Farbstoff dunkel gefärbt, nicht selten ist dieser auch in den gewöhnlichen Epidermiszellen enthalten, niemals aber in den Schließzellen.

Soweit bisher untersucht, erscheinen uns also die Schließzellen derjenigen Involukralblätter, die durch Anthoorphin grau gefärbt sind, farblos. Brat und Weber (1951) haben gezeigt, daß ungefärbt aussehende Schließ-

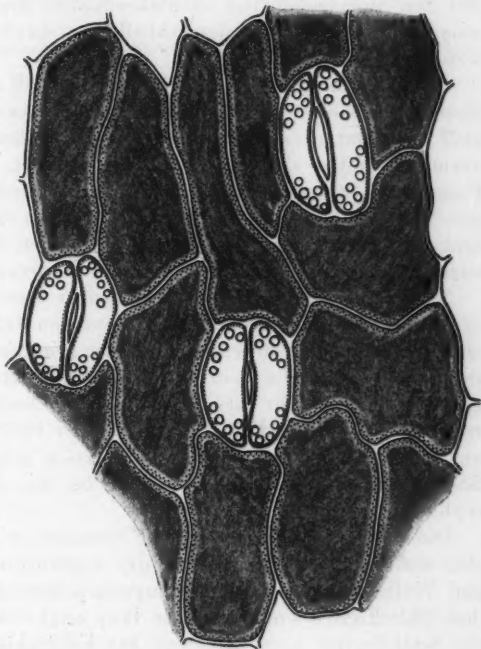


Abb. 1.

Epidermis des Involukralblattes von *Crepis biennis*

zellen von Nymphaeaceen-Blütenblättern auf Zusatz von Ammoniakwasser gelb werden, woraus man schließen darf, daß der Zellsaft dieser Schließzellen Anthoxanthin enthält. Es wurde geprüft, ob vielleicht auch die „farblosen“ Stomazellen der Involukralblätter der Kompositen Anthoxanthin besitzen. Bei *Bellis perennis* und bei *Leontodon hispidus* ist dies tatsächlich der Fall: Der Schließzellen-Zellsaft nimmt bei Zusatz von Ammoniakwasser oder verdünnter KOH eine mehr oder weniger intensive Gelbfärbung an. Bei den Stomazellen der Involukralblätter anderer Kompositen läßt sich eine solche Gelbfärbung der Schließzellen durch die genannten Reagenzien nicht erzielen.

Möbius hat den schwarzbraunen Farbstoff durch das Verhalten gegenüber verschiedenen Reagenzien zu charakterisieren versucht. Für den Farbstoff von *Centaurea Scabiosa* und *Plantago lanceolata*, von dem Möbius vermutet, daß er sich von Anthozyan ableitet, gibt er an, daß sich dieses Pigment in Schwefelsäure „rot“ färbt. Die dunklen Farbstoffe der vielen von Möbius untersuchten Kompositen geben diese Rotfärbung aber nicht, und dies gilt auch für die in der vorliegenden Arbeit angeführten Kompositen: In Schwefelsäure tritt keine Farbänderung ein.

Schittengruber (1953) hat darüber berichtet, daß auf Zusatz von verdünnter ($\frac{1}{10}$ normaler) Schwefelsäure im Zellsaft der Involukralblätter ohne Farbänderung entweder granuläre „Gerinnung“ eintritt oder ein Kontraktionsvorgang. Die Kontraktion des anthoorphninhaltigen Zellsaftes hat große Ähnlichkeit mit derjenigen des durch Anthozyan gefärbten Zellsaftes von *Cerinthe major* (Kenda und Weber 1952). In beiden Fällen sind es nur gefärbte Zellsäfte, die die Kontraktion zeigen: Der Farbstoff bei den Boraginaceen ist das Anthozyan, der bei den Kompositen ist das Anthoorphnin.

Die *Cerinthe*-Korolle hat keine Stomata, es ließ sich an dieser Pflanze also nicht entscheiden, ob auch der ungefärbte Zellsaft zur Kontraktion und Verfestigung neigt. Die Kompositen-Involukralblätter haben Stomata, ihre Schließzellen sind ungefärbt. Hier zeigt es sich nun, daß die Vakuolen der Schließzellen keine Tendenz zur Kontraktion haben und auch keine Tendenz zur Verfestigung. Während die Protoplaste der gewöhnlichen Epidermiszellen, wenn sie viel Anthoorphnin in der Vakuole enthalten, eckig plasmolysieren, ist die Plasmolyseform der stets anthoorphninfreien Schließzellen konvex.

Zusammenfassung

Der zuerst von Möbius beschriebene graubraune bis schwarze Farbstoff der Epidermiszellen der Involukralblätter von Kompositen wird zur Unterscheidung von Anthophaein als Anthoorphnin bezeichnet. Während das Anthoorphnin in den gewöhnlichen Oberhautzellen dieser Blätter vorkommt, fehlt es in den Schließzellen vollkommen. Die Schließzellen der Involukralblätter mancher Kompositen enthalten Anthoxanthin (Gelbfärbung mit Ammoniak). Die anthoorphninhaltigen Vakuolen der Epidermiszellen neigen zu aktiver und zu passiver Kontraktion und Verfestigung, der anthoorphninfreie Zellsaft der Schließzellen dagegen nicht.

Literatur

- Brat und Weber, 1951: Anthoxanthin in den Schließzellen der Kronblätter von *Victoria amazonica* und *Nymphaea zanzibariensis*. *Phyton* 3.
- Kenda und Weber, 1952: Rasche Vakuolen-Kontraktion in *Cerithe*-Blütenzellen. *Protoplasma* 41.
- Möbius, 1900: Das Anthophaein, der braune Blütenfarbstoff. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 18.
- 1927: Die Farbstoffe der Pflanzen. *Linsbauers Handbuch der Pflanzen-anatomie*, Lief. 20.
- Schittengruber, 1953: Kontraktion anthoorphinhaltiger Vakuolen. *Protoplasma* 42.

Kontraktion Anthoorphin-haltiger Vakuolen

Von

Brigitte Schittengruber

Mit 3 Textabbildungen

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

(Eingelangt am 22. Dezember 1952)

Schittengruber (1953) hat den braunschwarzen Farbstoff, der nach Möbius (1927) in den Epidermiszellen der Involukralblätter vieler Kompositen vorkommt, Anthoorphin genannt. Die Intensität der Färbung, die die Oberhaut der Hüllblätter durch dieses im Zellsaft enthaltene Pigment erhält, ist nicht nur bei verschiedenen Species verschieden, sie hängt vielmehr auch bei ein und derselben Art wesentlich von der Jahreszeit ab, und zwar dürfte die Temperatur dabei die ausschlaggebende Rolle spielen. Bei Kompositen, die bei uns im Freien bis in den Spätherbst hinein blühen, wie *Bellis*, *Taraxacum*, *Leontodon*, läßt sich leicht bemerken, daß die Unterseite der Involukralblätter in der warmen Jahreszeit blaßgrau erscheint, in der kälteren Jahreszeit aber, in der die Nachttemperaturen um den Nullpunkt schwanken, wesentlich dunkler grau, fast schwärzlich ist. Dieser makroskopisch sichtbare Unterschied in der Intensität der Färbung ist, wie sich mikroskopisch feststellen läßt, dadurch bedingt, daß der Zellsaft im Spätherbst mehr Anthoorphin enthält als in der wärmeren Jahreszeit. Die Vorgänge an den Anthoorphin enthaltenden Vakuolen, über die im folgenden berichtet wird, sind um so deutlicher ausgeprägt, je dunkler gefärbt der Zellsaft ist. Die Beobachtungen wurden daher hauptsächlich in den Monaten Oktober und November gemacht, und zwar an Pflanzen, die kurz vorher aus dem Freien (Botanischer Garten oder Umgebung von Graz) entnommen wurden. Am besten eignen sich zu den Versuchen die Hüllblätter von *Bellis perennis* und *Taraxacum officinale*.

Normalerweise nimmt die durch Anthoorphin grau gefärbte Vakuole in den Epidermiszellen der Hüllblattunterseite den größten Teil des Zell-Lumens ein, das Cytoplasma ist auf einen schmalen wandständigen Saum eingeschränkt. Stets findet man aber in mehr oder weniger zahlreichen Oberhautzellen die zentrale Vakuole wesentlich verkleinert. Die so kontrahierte Vakuole ist dann dunkler gefärbt, fast schwarz. Zwischen dem wandständig gebliebenen Cytoplasma befindet sich ein leer aussehender,

mit farblosem Zellsaft erfüllter Raum. Die Zellen sind lebend und anscheinend nicht geschädigt. Es ist in solchen Zellen also eine vitale Vakuolenkonzentration (kurz „Vako“) vor sich gegangen, die als „spontan“ zu bezeichnen ist, da sie ohne experimentelle Eingriffe „von selbst“ erfolgt ist.

Spontane und (durch Verletzung oder Vitalfärbung) induzierte Vakuolenkontraktionen sind in Pflanzenzellen nicht gerade selten (Lit. bei Küster 1951). Was aber die Vakuolenkontraktion in den Hüllblättern der Kompositen auffallend macht, ist, daß die kontrahierte Vakuole sich nicht abrundet, wie dies bei Zellen mit flüssigem Zellsaft (etwa bei *Allium*-Epidermiszellen) der Fall ist (Küster 1927). Die verkleinerten Vakuolen der Involukralblatt-Oberhautzellen sind vielmehr eckig und haben in reduzierter Dimension die Form der Zelle bewahrt. Ein solches Verhalten ist nur von „festen“ (festwerdenden) Zellsäften zu erwarten. Es wurde zuerst von Gicklhorn und Weber (1926) beobachtet und später von einer Reihe von Autoren an Boraginaceen-Blütenzellen beschrieben, so daß sogenannte „feste Zellsäfte“ für Boraginoideen ganz allgemein als charakteristisch angesehen werden dürfen. Die Kontraktion der Vakuole anthozyan-gefärbter Boraginaceen-Blütenblattzellen führt zur Bildung von „Anthozyanophoren“, das heißt gallertigen Gebilden, an die das Anthozyan gebunden ist. Der Vorgang wurde von Weber (1935) als Synärese aufgefaßt.

In den grau gefärbten Zellen der Kompositen-Hüllblätter spielt sich offenbar der gleiche Vorgang ab: Die Vakuole kontrahiert sich, der Zellsaft wird dabei fest, der graue Farbstoff bleibt an das Gel gebunden und das Gebilde, das dabei entsteht, kann, in Analogie zur Bezeichnung Anthozyanophor, als Anthoorphinophor bezeichnet werden.

Der kontrahierte Zellsaft (Anthozyanophor) der Boraginaceen ist weich, gallertig, kein Xerogel. Einen weit höheren Grad an Festigkeit kann die kontrahierte Vakuole der Hüllblattzelle, der Anthoorphinophor, erreichen: Er wird spröde und kann wie Glas in Splitter mit scharfen Bruchflächen zerspringen (Abb. 1). Merkwürdig ist, daß beim Zerschlagen des Anthoorphinophors die Zellen nicht zugrunde gehen, sondern unverändert plasmolysierbar bleiben.

Man wird bei diesem Verhalten des Anthoorphinophors erinnert an das des Anthozyanophors im Blütenblatt von *Pelargonium zonale*, der ebenfalls in Teilstücke mit zackigem Bruch zerfallen kann (Toth 1951).

Welche Kräfte das Zersplittern des festgewordenen Zellsaftes verursachen, ist nicht ersichtlich. Man könnte daran denken, daß bei der Präparation (Abziehen der Epidermis) Spannungen auftreten. Es läßt sich aber an durch Infiltration mit Wasser durchsichtig gemachten Hüllblättern sehen, daß schon in den Epidermiszellen intakter Blätter „zerbrochener Zellsaft“ vorkommen kann. Man könnte auch daran denken, daß bei Frösten (in einigen Nächten sank die Temperatur bis auf -4°C) der Zellsaft durch Gefrieren zersplittert. Dagegen spricht, daß auch schon zu Beginn des Herbstes, vor Eintritt von Frösten, wenn auch seltener, zersprungene Zellsäfte zu sehen sind.

Wie erwähnt, findet die „spontane Vako“ nicht in allen Epidermiszellen der Hüllblätter statt. Es ergab sich so die Gelegenheit zu prüfen, ob es mög-

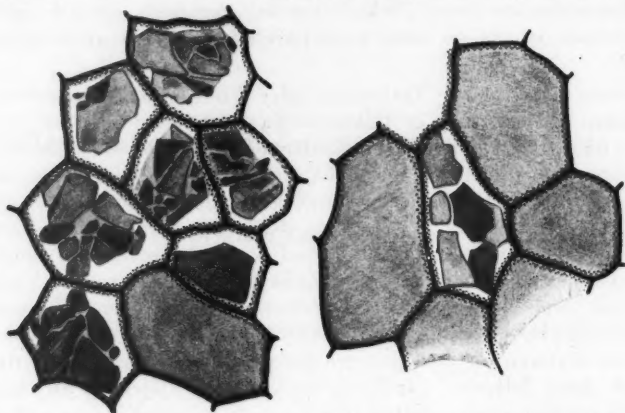


Abb. 1. Epidermiszellen eines Involukralblattes von *Bellis perennis*. Der durch spontane Vako festgewordene Zellsaft z. T. zersplittert.

lich ist, Vako experimentell auszulösen. Zu den darauf hinggerichteten Versuchen gab folgende Beobachtung von Kenda und Weber (1952) die

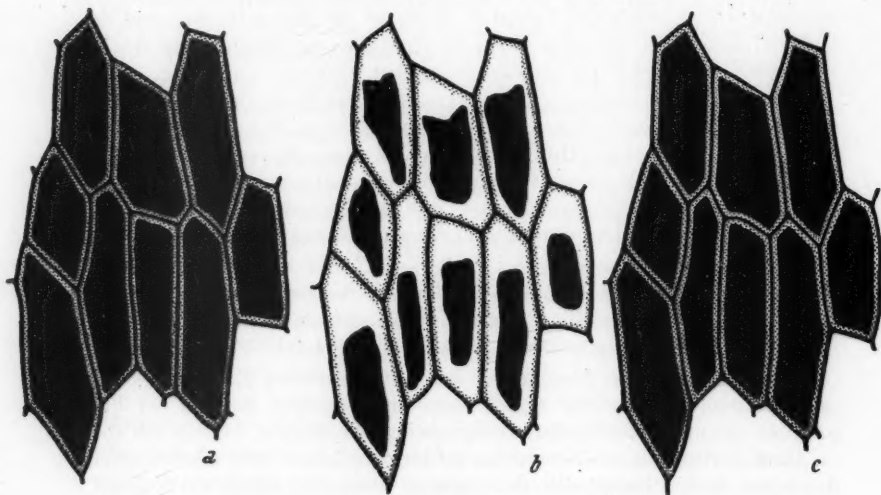


Abb. 2. Epidermiszellen eines Involukralblattes von *Leontodon hispidus* a in Wasser, b in verdünnter Schwefelsäure, c in verdünntem Ammoniak.

Anregung. In den anthozyanrot gefärbten Zellen der Blüte von *Cerithe major* kann durch verdünnte Schwefelsäure Vako ausgelöst werden, und

diese Vako ist durch Zusatz von Ammoniak (KOH) wieder rückgängig zu machen.

Wird zu Epidermisstreifen, deren Zellen Anthoorphin enthalten und deren Vakuolen nicht durch spontane Kontraktion verkleinert sind, $\frac{1}{10}$ normale Schwefelsäure zugesetzt, so erfolgt in geeigneten Zellen Kontraktion der Vakuole. Diese Vako geht zwar nicht so blitzartig rasch vor sich wie die in den *Cerithe*-Zellen, immerhin aber so schnell, daß das Fortschreiten der Verkleinerung der Vakuole im Mikroskop leicht verfolgt werden kann¹ (Abb. 2).

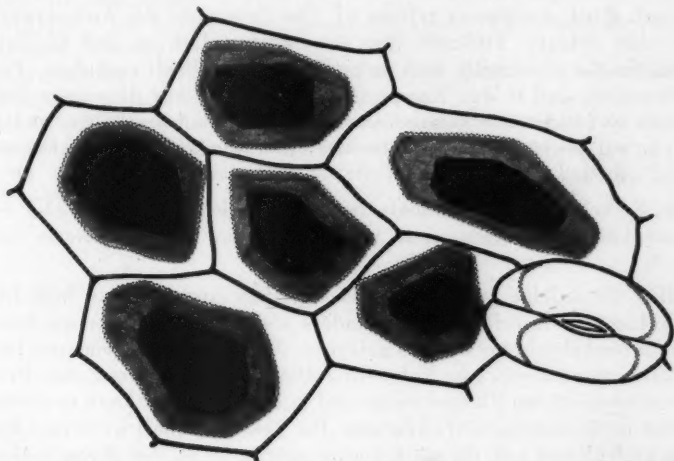


Abb. 3. Epidermiszellen eines Involukrallblattes von *Taraxacum officinale*. Zellen zuerst in 1 mol Kalisalpeter-Lösung plasmolysiert, dann — nach Absaugen des Plasmolytikums — verdünnte Schwefelsäure zugesetzt. In den edig plasmolysierten Protoplasten der gewöhnlichen Epidermiszellen erfolgt induzierte Vako der anthoorphinhaltigen Vakuole, in den konvex plasmolysierten Protoplasten der Schließzellen erfolgt keine induzierte Vako der anthoorphinfreien Vakuole.

Wird dann die Säure durch Lauge ersetzt, so geht die Vako zurück und der Zellsaft nimmt wieder sein ursprüngliches Volumen ein. Es ist gelungen, die Vakuolen-Systole und Diastole durch Wechsel der Reaktion des Mediums bis zu achtmal an ein und derselben Zelle zu wiederholen.

Das im wesentlichen gleiche Verhalten der anthoorphinhaltigen Zellsäfte der Kompositen mit dem der Boraginaceen-Zellsäfte läßt es wahrscheinlich sein, daß bei dem Kompositen wie bei den Boraginaceen die gleiche oder doch eine ähnliche Substanz dafür verantwortlich ist. Hof-

¹ Bei der Vakuolenkontraktion kann sich die Vakuole entweder vom Cytoplasma trennen und dieses wandständig bleiben, wie dies in Abb. 2 b dargestellt ist, oder das Cytoplasma geht mit der Vakuole mit, trennt sich also von der Zellwand.

meister (1940) hat die Ansicht geäußert, daß Pektine den wesentlichen Bestandteil des Boraginoideen-Zellsaftes ausmachen. Kenda und Weber (1952, 1953) haben sich dieser Meinung angeschlossen und vermuten, daß die Kontraktion und Dilatation des Vakuoleninhaltes von *Cerinth* durch Veränderung der Ionisation der Fadenmoleküle von Pektinen ausgelöst wird. Härtel (1953) hat weitere Argumente zugunsten dieser Vorstellung erbracht. Der Gedanke liegt nahe, daß auch bei der Vako in den Epidermiszellen der grauen Hüllblätter der Kompositen Pektine eine Rolle spielen.

Bei *Cerinth* geht die reversible Vako nur in den Zellen vor sich, deren Zellensaft durch Anthozyan gefärbt ist. Die Bedeutung des Anthozyans ist dabei nicht geklärt. Vielleicht liegt die Sache einfach so, daß die Zellen mit Anthozyan gleichzeitig auch mehr Pektin im Zellsaft enthalten. Es ist beachtenswert, daß in den Kompositen-Hüllblättern nur diejenigen Zellen spontane oder induzierte Vako zeigen, die Anthoorphinin enthalten, und daß die Vako um so stärker wird, je dunkler die Vakuolen durch den Farbstoff tingiert waren.

Die Schließzellen der Stomata besitzen farblose Vakuolen, also kein Anthoorphinin, sie zeigen auch weder spontane noch induzierte Vako (Abb. 3).

Zellen, die infolge nur geringen Gehaltes an Anthoorphinin bloß lichtgrau gefärbt sind, verhalten sich anders als durch Reichtum an diesem Farbstoff dunkelgrau bis schwarz gefärbte. Sie zeigen im allgemeinen keine oder nur eine ganz schwache Vako, ihr Zellsaft ist (noch) flüssig, ihre Protoplaste runden sich bei Plasmolyse ab und in ihrem Zellsaft kann es zu einer Entmischung (Koazervation?) kommen. Ihr Vakuoleninhalt weist manchmal je eine große Kugel auf, die stärker grau gefärbt ist als der übrige Zellsaft, seltener sieht man in der Vakuole viele kleine graue Kugeln in dem dann nur ganz schwach gefärbten Saft, das typische Bild einer „tropfigen Entmischung“.

Zusammenfassung

Die durch Anthoorphinin grau bis schwarz gefärbten Vakuolen der Epidermiszellen der Unterseite der Involukralblätter mancher Kompositen können spontane Kontraktion erleiden. Dabei wird der Zellsaft fest und die kontrahierte Vakuole rundet sich daher nicht ab. Es liegen hier „feste Zellsäfte“ vor wie bei den Boraginaceen. Die Zellsäfte können spröde werden und in der lebenden Zelle wie Glas in Bruchstücke zerspringen. In Zellen, in denen keine spontane Vakuolenkontraktion (Vako) eingetreten ist, kann die Vako durch Zusatz von $\frac{1}{10}$ normaler Schwefelsäure ausgelöst werden. Diese induzierte, rasch ablaufende Vako ist insofern reversibel, als sie durch Laugenzusatz rückgängig gemacht werden kann. Kontraktion und Dilatation des Zellsaftes kann wiederholt veranlaßt werden. Es wird vermutet, daß das eigenartige Verhalten der grauen Kompositen-Zellsäfte ebenso wie das des anthozyanroten Zellsaftes von *Cerinth* durch den Gehalt an Pektin bedingt ist.

Literatur

- Gicklhorn und Weber, 1926: Über Vakuolenkontraktion und Plasmolyseform. Protoplasma 1.
- Härtel, 1953: Das Verhalten des „festen Zellsaftes“ von *Cerithe* bei Fluorochromierung mit Acridinorange. Protoplasma 42.
- Kenda und Weber, 1952: Rasche Vakuolenkontraktion in *Cerithe*-Blütenzellen. Protoplasma 41.
- — — 1953: Zweimalige Vakuolenkontraktion in *Cerithe*-Zellen. Phyton 4.
- Küster, 1927: Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. Protoplasma 1.
- 1951: Die Pflanzenzelle. 2. Aufl. Jena.
- Möbius, 1927: Die Farbstoffe der Pflanzen (Linsbauers Handbuch der Pflanzenanatomie, Lief. 20).
- Schittengruber, 1953: Das Anthoorphin der Kompositen-Involukrallblätter fehlt ihren Schließzellen. Protoplasma 42.
- Toth, 1951: Mikrurgische und mikrochemische Untersuchung der festen Anthozyankörper im Blütenblatt von *Pelargonium zonale*. Protoplasma 40.
- Weber, 1935: Vakuolenkontraktion der Boraginaceen-Blütenzellen als Synärese. Protoplasma 22.

Kurze Mitteilung

Zur Frage des Plasmalemmas bei *Spirogyra*

Von

Karl Höfler

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 19. Dezember 1952)

Frühere Beobachtungen über die Wirkung der Soda-Plasmolyse auf verschiedene Pflanzenzellen (Höfler 1951) haben zum Ergebnis geführt, daß die Resistenz gegen Na_2CO_3 -Lösungen außerordentlich verschieden ist und daß dafür eine ungleiche Schutzwirkung der äußeren Plasmagrenzschicht, des Plasmalemmas, verantwortlich sein dürfte. Die mitgeteilten Versuche haben noch nicht bewiesen, aber wahrscheinlich gemacht, daß das — relativ zarte — Plasmalemma von *Spirogyra* wesentlich anders strukturiert ist als dasjenige anderer Algen. Ein unterscheidendes Merkmal läßt sich fassen. Wie Weber (1952) dargetan hat, ist Ca bei *Spirogyra* zur Restitution des durch Plasmolyse gestörten Plasmalemmas notwendig. „Dagegen ist am Aufbau der dichten und dauerhaften Plasmagrenzschicht der Desmidiaceen, die auch durch Kaliumoxalat nicht zerstört wird, das Ca vermutlich nicht entscheidend beteiligt“ (Höfler 1951, S. 457).

Die damals von mir untersuchten Spirogyren gaben in hypertonischer Sodalösung stets das Bild bunter Nekrose (S. 545, Abb. 6), wie sie ähnlich zuerst von Weber (1931, 1933) an Spirogyren bei Harnstoff- oder Alkoholbehandlung beobachtet worden war.

Ich will im folgenden über eine kleine Reihe von Versuchen berichten, die im November 1952 mit einer anderen *Spirogyra* durchgeführt wurden. Die Algen sind am 13. November im sogenannten Wasserpark an der Donau in Wien-Floridsdorf gesammelt worden. Die gleiche *Spirogyra* steht seit 20 Jahren im Wiener Institut im Herbst zur Verfügung. Die Zellen sind $52\text{--}56\ \mu$, meist $54\ \mu$ breit und etwa doppelt so lang, haben einen breiten, ziemlich dicht gewickelten, gekielten und am Saum gelappten Chromatophor mit 5–6 Umläufen und flache, ungefaltete Querwände. Die Art wurde noch nicht kopulierend und fruchtend gesammelt. Sie findet sich meist zusammen mit der ähnlichen, aber wesentlich breiteren ($68\text{--}71\ \mu$) *Spirogyra gallica*

Petit (vgl. Schindler 1958 a, b, Eibl 1959 a, b, S. 162), welche einige Male fruchtend gefunden wurde und bestimmt werden konnte. Wir nennen die Alge im Institut *Spirogyra „pseudogallica ad interim“*. Nach Transeau (1951) Zygnemataceen-Monographie, die auch die vegetativen Merkmale berücksichtigt, gehört die Alge vermutlich zu *Spirogyra condensata* (Vaucher) Kütz. 1843, S. 279. Es ist dies (neben *Spir. labyrinthica* Trans. 1934 = *Spir. daedalea* var. *major* Hirn 1913) die einzige europäische einbändige *Spirogyra* mit glatter Querwand, deren vegetative Fäden über 50μ (nach Transeau 45–60 μ) breit sind. Die Art ist „widely distributed in Europe; reported from South America. Characterized by its short cells and closely spiraled chromatophores. Sterile cells sometimes inflated“ (Transeau, S. 152). Die von Toth, Graf und Richter (1943, S. 302) für *Spir. „pseudogallica“* beschriebenen, kalottenförmigen Plasmaansammlungen an jüngeren Querwänden beobachtete ich an meinem Material nur bei *Spirogyra „pseudogallica“* = *condensata*, nicht an der beigemengten *Spirogyra gallica*.

Am 15. November untersuchte ich zunächst das Verhalten in Traubenzucker- und KCl-Lösung abgestufter Konzentration $T = 15\text{--}13,5^\circ\text{C}$. Der osmotische Wert der Zellen lag um 0,5 mol Trbz. Hier gab etwa die Hälfte der Fäden Eckenplasmolyse, die Hälfte keine Plasmolyse oder schwächste in ganz vereinzelter Zellen. Bei 0,4 mol und darüber Zucker trat überall normale Plasmolyse ein. In 0,4 mol war der erreichte Grad 0,73₆, 0,70₃, 0,74₅, in einem anderen gesunden Faden 0,83₂, 0,84₅. Nur in wenigen, wohl herbstlich „kranken“ Fäden trat fortschreitende Plasmolyse (de Vries 1885, S. 567) mit unregelmäßigen Umrissen ein.

In 0,5 n KCl ergab sich das Bild bunter Nekrose. Ein Teil der Zellen läßt schöne konvexe oder anfänglich unregelmäßig umrissene Plasmolyse eintreten, ein anderer Teil liefert primäre Tonoplaststadien. Die nach 25–35 Min. vorgenommene Auszählung ergab:

lebend 6 10 13 2 1 2 2 1 4 1 1 1 1 1 2 3 1 5 2 3 2 7 2 1 1 1 1 2 5 1 2 6 2 3 2 1 1 3 1 2 4 2 5 2 2 = 113 = 62 %
Tonoplasten 1 1 2 1 2 1 1 1 1 2 2 2 1 2 1 1 2 3 2 1 1 1 2 1 2 2 1 2 2 1 1 1 1 5 1 1 3 1 1 1 1 1 1 3 = 99 = 38 %

Es waren somit 62% der Zellen plasmolysiert und lebend, 38% zeigten klare, glatt abgekugelte Tonoplasten. — Zu ähnlichen Werten hatten Eiselsbergs (1937) Auszählungen an anderem *Spirogyra*-Material geführt. Die mittlere „Mortalität“ betrug in ihren Versuchen in 0,4 n NaCl-Lösung 45% (35–50%), in 0,4 n KCl-Lösung 50% (20–50%). Bei Zusatz steigender Vol.-%-Anteile von 0,29 und CaCl_2 zur plasmolisierenden Alkalisalzlösung stieg der Anteil der überlebenden Protoplasten (Abb. 1).

Am selben Tag habe ich vergleichbare Reihenversuche mit Sodalösungen (1,0 n, 0,9 n ... 0,1 n) durchgeführt. Aus guten *Spirogyra*-Locken wurden mit einem scharfen Scherchen gleich lange Fadenstücke herausgeschnitten und in einen großen Tropfen Standortswasser gelegt. Von da brachte ich mit der Pinzette jeweils kleine Büschel in die Tropfen der einzelnen zu prüfenden Lösungen, wobei die Verdünnung durch das den Fadenstücken anhaftende Wasser vernachlässigt werden konnte. Die Sodaversuche verliefen folgendermaßen:

In allen hypertonen Lösungen wurde die überwiegende Mehrzahl der Zellen rasch getötet, nur einzelne Zellen blieben lebend und ließen eine völlig normale Plasmolyse mit baldiger Rundung eintreten. In 0,7 *n* zeigten drei Fadenstücke unter 90 Zellen 11 lebende, unter 86 Zellen 7 lebende, unter

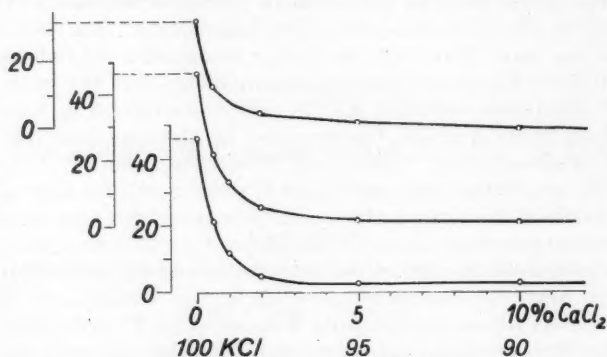


Abb. 1. Nach Eiselsberg (1937, S. 551, Abb. 4). Entgiftung einer 0,4 *n* KCl-Lösung durch Zusätze von 0,29 *n* CaCl₂-Lösungen. Abszisse: Vol. % CaCl₂, Ordinate: Prozent der getöteten Zellen. *Spirogyra* sp. aus Oberösterreich.

90 Zellen 5 lebende, in einem vierten Faden war keine Zelle lebend und plasmolysiert. In den primär getöteten Zellen, wo also Plasmalemma und Binnenplasma von der Sodalösung überrannt worden waren, fanden sich aber ausnahmslos zart konturierte Tonoplasten mit leicht krümeligem

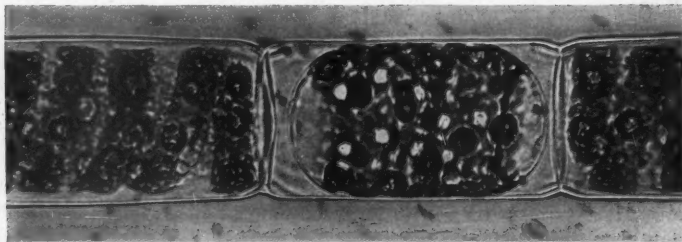


Abb. 2. *Spirogyra* „*pseudogallica*“ (= *condensata* [Vauch.] Kütz.?) in 0,5 *n* Na₂CO₃. Lebende Zelle zwischen nekrotischen Zellen. 17. November 1952.

Vakuoleninhalt. Meist lagen zwei, selten nur ein Tonoplast in der Zelle. Gewöhnlich schoben die Tonoplasten, indem sie der Kugelform zustreben, die Chloroplastenbänder auseinander. Das führt bei der dichtgewickelten *Spirogyra* „*pseudogallica*“ (= *condensata*) zu kennzeichnenden Bildern (Abb. 3). Nur in vereinzelt Zellen hatte sich die grüne Schraube verschmälert und hatte die Chloroplasten zu zylindrischer Form in die Länge gepreßt. In einer Zelle, die im entspannten, turgorlosen Zustand 142 μ lang

und außen $49,5 \mu$, innen $46,7 \mu$ breit war, waren die zwei Tonoplasten osmotisch stark verkleinert und 49 und 45μ lang und $28,5 \mu$ breit.

Die Ablesung des Reihenversuches zeigte, daß der Hundertsatz der überlebenden Zellen in $0,9$ bis $0,4 n$ Soda überall gleich groß bzw. gleich klein war, daß also schwächere Hypertonie die Zahl der überlebenden Zellen nicht oder kaum erhöht. Etwa 10% der Zellen, regellos in den Zellen verteilt, überlebten die Sodaeinwirkung und gaben normale Plasmolyse. Diese erreichte z. B. in $0,5 n$ den Endgrad von $0,56$; im betreffenden Fadenstück lebten 7 von 92 Zellen, in den anderen, nekrotischen waren meist zwei große kugelige Tonoplasten vorhanden, welche die Chloroplasten auseinanderdrängten. Abb. 2 zeigt eine lebende Zelle zwischen ihren nekrotischen Nachbarn nach einem gleichen Versuch in $0,5 n$ vom 17. November. Der Kontrollversuch in $0,5$ mol Traubenzucker ergab lauter normal konvexe Plasmolysen.

In $0,4 n$ Na_2CO_3 zeigten im Reihenversuch vom 15. November einzelne Zellen Plasmolysen entsprechend schwächeren Grades, viele Fäden auch durchwegs Tonoplastenstadien. In $0,3 n$ erschien meist keine Plasmolyse, alle Zellsäfte waren getrübt, die Chloroplasten befanden sich in der ursprünglichen Lage oder waren ein wenig auseinandergedrängt. Bloß in zwei Fäden des Präparats gab es ganz vereinzelte lebende Zellen, welche Grenzplasmolyse zeigten und innen zwei elliptische Tonoplasten mit klarem Inhalt, d. h. ohne Niederschlag in den Vakuolen, eben erkennen ließen.

In der hypotonischen Lösung von $0,2 n$ Na_2CO_3 waren auch die meisten Zellen nekrotisch, immerhin fanden sich Fäden mit mehr überlebenden Zellen. Der Unterschied zwischen lebenden und geschädigten war auch ohne Plasmolyse deutlich, die lebenden zeigten wie im unbehandelten Material dunkelgrüne, gekielte und am Rand gelappte Chloroplasten mit deutlichen Pyrenoiden, in den nekrotischen war das Grün der Chloroplasten ein wenig matter, diese waren gequollen, später schlauchähnlich (vgl. Küster 1937, Hofmeister 1937, Schindler 1939), im optischen Querschnitt kreisrund bis längselliptisch, die Pyrenoide waren verschwunden, die Bänder infolge der Volumzunahme einander genähert. Die Zellsäfte waren getrübt, die Protoplasten aber nicht geschrumpft. Es handelt sich um ein Tonoplastenstadium ohne Plasmolyse. Die Auszählung ergab im besterhaltenen Faden:

lebend	1	2	1	1	2	2	4	7	1	2	1	2	=	26
tot	2	3	2	1	1	3	3	2	1	1	1	3	=	24

Hier lebte also die Hälfte der Zellen. In anderen Fäden waren alle oder fast alle Zellen getötet. Als der Reihenversuch nach $1\frac{1}{2}$ Stunden nochmals abgelesen wurde, ließen im Präparat in $0,2 n$ (100 Min. nach dem Einlegen) die überlebenden Zellen eine starke Vorwölbung der Querwände gegen die turgorlosen Nachbarzellen hin erkennen, die Zellsäfte waren klar, frei von Sodafällung, das Plasma hatte also dicht gehalten. Ich saugte nun $0,5$ mol Trbz., sodann $0,6$ mol Trbz. durch das Präparat, es trat in vielen Zellen noch Plasmolyse mit glatten Konturen ein. — In $0,1 n$ Na_2CO_3 war nach einer Stunde noch ein Teil der Zellen lebend, der Anteil ungleich, z. B. in einem Faden 28 von 76 , in einem anderen 47 von 61 , andere Fäden waren völlig getötet.

Auf die interessanten Vorgänge beim Aufquellen der Chloroplasten während der Sodanekrose will ich hier nicht eingehen. Schindler hat für *Spirogyra gallica* die Vorgänge bei NH_3 - und NaOH -Einwirkung eingehend beschrieben. Meine *Spirogyra* „*pseudogallica*“ zeigt eine vorübergehend auftretende Längsrünzelung der Plastiden-Oberflächen und erscheint auch durch diesen Zug gekennzeichnet.

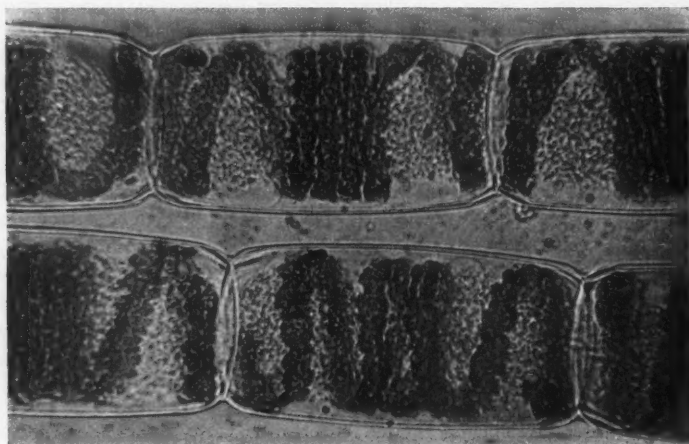


Abb. 3. *Spirogyra* „*pseudogallica*“ (= *condensata*?) in 0,5 n Na_2CO_3 . In allen Zellen Tonoplastenstadium. 17. November 1952.

Der wiedergegebene Reihenversuch zeigt, daß nicht nur hypertonische, sondern auch hypotonische Sodalösungen die meisten Zellen primär töten, daß also das zarte Spirogyren-Plasmalemma auch ohne mechanisch-osmotische Losreißung von der Zellwand dem Angriff der Sodalösung erliegt. Die Lösung dringt dann unmittelbar bis an die Tonoplasten vor, diese widerstehen aber überall und verkleinern sich bei Hypertonie der einwirkenden

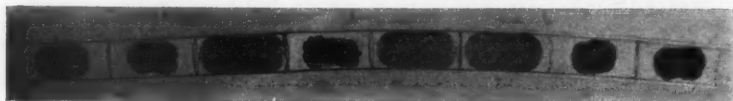


Abb. 4. Bunte Nekrose bei *Spirogyra* sp. (29. April 1952).

Lösung im entsprechenden Maß. Anfangs bleiben die Zellsäfte klar. Beobachtet man in 0,5 n Na_2CO_3 , so sieht man bald (binnen 1 Min.) solche beginnende Tonoplasten-Plasmolyse. Aber nachher stellt sich schon nach 2—4 Min. auch die Trübung in den Zellsäften ein.

Bei meinen früher (1951, S. 445—449) beschriebenen *Spirogyra*-Versuchen konnten bezüglich der Vakuolenwandung zwei Verhaltensweisen unterschieden werden. Den in üppigem Wachstum befindlichen Spirogyren aus

Moosbrunn (im Flachland des östlichen Niederösterreich), die am 18. November 1950 untersucht wurden, fehlte der resistente Tonoplast, und beim Eintritt der bunten Nekrose bewirkte die Soda in den „überraunten“ Zellen überall eine starke Trübung infolge von Gerbstofffällung in den Vakuolen. In den Ramsauer *Spirogyra*-Materialien aus älteren Fäden wurden nur Plasmalemma und Binnenplasma überraunt, die osmotisch verkleinerten Tonoplasten hielten stand und jede Niederschlagsbildung im Zellsaft fehlte. Die herbstliche *Spirogyra* „*pseudogallica*“ (= *condensata*) vom Donauufer verhielt sich nun intermediär, überall überdauern die zarten Tonoplasten den ersten osmotischen Angriff, aber nach wenigen Minuten setzt die Trübung der Zellsäfte ein. Eine jung erwachsene mehrbändige *Spirogyra* vom Habitus der *Spirogyra nitida* aus einem Teich bei Sulz im Wienerwald, die ich zu Ende April 1952 untersuchte, ließ resistente Tonoplasten vermissen. Die „bunte Nekrose“ war die gleiche wie sonst (Abb. 4). Naturgemäß entscheidet nicht der wechselnd ausgebildete Tonoplast, sondern das Plasmalemma über das Schicksal der Zellen in der Na_2CO_3 -Lösung.

Weber (1931, 1933) hat für eine *Spirogyra* (wahrscheinlich *crassa*) sehr auffällige Resistenzunterschiede zwischen „jungen“, kürzlich geteilten und noch nicht gestreckten Zellen und „alten“, herangewachsenen Zellen beschrieben. Die jungen waren gegen jähe Harnstoffplasmolyse (2 mol) vielfach resistent, während die alten getötet wurden. Gegen 16–20%igen Methylalkohol waren umgekehrt die alten Zellen resistent, die jungen auffallend empfindlich. Es handelt sich wohl vor allem um Unterschiede der Intrabilität. Weber verweist in der Diskussion (1933, S. 17) auf folgende Möglichkeit: „Der Harnstoff kann als Typus eines wasserlöslichen, lipoidunlöslichen Stoffes, der Alkohol als Typus eines lipoidlöslichen Stoffes betrachtet werden; insofern als eine Verallgemeinerung zulässig ist (was erst weitere Versuche entscheiden können), wären die *Spirogyra*-Zellen im Stadium des Streckungswachstums in erster Linie für lipoidunlösliche Stoffe leicht permeabel, im Stadium des Teilungswachstums aber für lipoidlösliche.“

Mein erstes Material reichte zur Prüfung des entsprechenden Resistenzverhaltens gegen Na_2CO_3 nicht aus, da es nur Fäden mit Zellen enthielt, die erwachsen waren oder sich im Streckungswachstum befanden. Als aber nach kalten Frosttagen am 19. November Schönwetter eingesetzt hatte¹, sammelte Universitätsgärtner H. Küssel am Vormittag des 20. November optimales Material von *Spirogyra* „*pseudogallica*“ (und *gallica*), welches in den

¹) Von der Zentralanstalt für Meteorologie, Wien XIX, Hohe Warte, erhielt ich folgende Temperaturdaten:

1952	7 ^h	14 ^h	21 ^h	Mittel	1952	7 ^h	14 ^h	21 ^h	Mittel
11. 11.	2,6	5,3	3,1	3,7	17. 11.	—0,6	1,6	0,8	0,6
12. 11.	2,7	5,4	2,6	3,6	18. 11.	1,5	3,2	2,6	2,4
13. 11.	2,0	4,0	1,4	2,5	19. 11.	2,4	4,4	5,2	4,0
14. 11.	—2,4	2,2	0,3	0,0	20. 11.	6,3	7,1	6,1	6,5
15. 11.	0,2	1,1	0,4	0,6	21. 11.	4,2	5,7	6,0	5,3
16. 11.	—2,0	0,5	—1,2	—0,9					

Die Wassertemperaturen am Standort selbst wurden nicht gemessen.

meisten Fäden kurze, jung geteilte Zellenpaare (so lang wie breit) und erwachsene ungeteilte Zellen (etwa zweimal so lang wie breit) enthielt. Der p_H des Standortswassers betrug um 7,5 bis 7,75. Ich ließ die in einigen Liter Standortswasser befindlichen Algen in einem temperierten Raum sich langsam auf 16° C erwärmen und trug dann die Fäden in die Versuchslösung von 20° ein. Die Resistenz in der Sodalösung war besser als an dem am 15. November bei 15° C untersuchten, übrigens zwei Tage alten Material, wohl auch, weil, nach Webers Satz von der Plasmolyse-resistenz, die Ablösung in der Wärme leichter erfolgt. Eine Zählung kurz nach Plasmolyse-eintritt ergab in 0,5 n Na_2CO_3 :

Tonoplasten 1 1 1 1 1 2 3 1 1 1 2 1 2 1 1 1 1 2 1 2 = 31 = 26,5%

lebend 3 4 7 2 9 5 5 6 2 1 2 4 10 4 1 2 2 1 1 3 5 4 3 = 86 = 73,5%

In einem anderen Faden waren nach 25 Min. von 50 Zellen 29 lebend, 21 tot.

Zehn Minuten nach dem Eintragen wurde in einem Faden der Lebenszustand der kurzen (im Teilungswachstum befindlichen) und der langen (erwachsenen) Zellen getrennt protokolliert:

kurz	{	lebend	2	4	4	1	3	2		= 16	
		tot									
lang	{	lebend	2		2	1		1	2	1	= 9
		tot (Ton.)	1	1	1	1	1	1	1	1	= 9

Hier waren alle jung geteilten Zellen in der Sodalösung am Leben geblieben, von den erwachsenen war die Hälfte lebend, die Hälfte tot. — Ein anderer Faden mit viel kurzen Zellen ergab bei der Auszählung, daß fast alle kurzen Zellen lebten, fast alle im Streckungswachstum befindlichen oder erwachsenen bis auf die Tonoplasten getötet wurden:

kurz	{	tot	1	1							= 2
		lebend	10	16	5	3	6	1	3	3	3
lang	tot	5	1	1		1	1	1	2	2	1
											1
											3
											5
											= 26

Fast alle kurzen Zellen leben hier (nur 2 sind tot), fast alle mittellangen und langen sind getötet.

In 0,2 n Na_2CO_3 , wo keine Plasmolyse eintritt, hebt sich das Plasma in den langen Zellen schon eine Minute nach dem Eintragen von den Querwänden in koaguliertem Zustand ab, so daß unregelmäßige, stark lichtbrechende Konturen sichtbar werden; nach 3—4 Min. erscheint die Trübung im Zellsaft. Die kurzen, jung geteilten Zellen bleiben intakt, die Plastiden bleiben zunächst rinnenförmig, der Zellsaft klar. Im Traubenzucker erfuhren ähnliche Fäden in allen Zellen, in kurzen und langen, eine gleich gute Plasmolyse²

²) Auch in 1/5 mol $CaCl_2$ plasmolysierten (in einem Versuch vom 8. Dezember) alle Zellen von *Spirogyra „pseudogallica“* normal und konvex — ebenso die meisten von *Spirogyra gallica*, während bei letzterer doch manche Protoplasten (z. B. 12 unter 200 eines Fadens) kollabierten.

In 0,5 n KCl blieben in einem langzelligen Faden 41 von 50 Zellen am Leben. Bei der Auszählung eines gemischtzelligen Fadens, der relativ stark geschädigt war, fanden sich unter den kurzen Zellen 9 lebende und 5 tote, unter den langen 2 lebende und 19 tote. In einem beigemengten Faden von *Spirogyra gallica*, der auch frische Zellteilungen aufwies, waren alle langen Zellen tot, alle kurzen am Leben.

Webers Erwartung, daß es die lipoidunlöslichen Stoffe sind, für welche die jung geteilten *Spirogyra*-Zellen eine erhöhte Resistenz und verminderte Neigung zu Intrabilitätserhöhung zeigen, wird durch die obigen Sodaver-suche bestens bestätigt. —

Vergleichende Resistenzversuche mit verschiedenen Algen zeigen meist eine relativ sehr hohe Empfindlichkeit der Spirogyren gegen wasserlösliche schädigende Agenzien. Die Standortsansprüche von *Spirogyra* im Freiland stehen damit in Einklang. An dieser Eigenart trägt wohl das zarte, wenig widerstandsfähige Plasmalemma der Gattung die Schuld.

Wenn auch der Anteil der bei gleicher Außeneinwirkung überlebenden und getöteten Zellen bei verschiedenen *Spirogyra*-Arten und wohl auch in verschiedenen physiologischen Zuständen in weiten Grenzen schwankt, so scheint die Grunderscheinung der bunten Nekrose doch allen bisher geprüften Spirogyren gemeinsam zu sein (nach Ausnahmen wäre zu suchen). Gerade darin nimmt aber das *Spirogyra*-Plasma auch innerhalb der Plasmen, die ihre Grenzschicht mit Ca aufbauen, eine Sonderstellung ein. Ob und wie diese Eigenart des Plasmalemmas etwa mit einer verstärkten Fähigkeit der Spirogyren zur Nährsalzabsorption zusammenhängen mag, bleibt zu untersuchen.

Zusammenfassung

1. Die plasmatische „Sonderorganisation“ von *Spirogyra* gegenüber anderen Algen besteht u. a. in der Zartheit des Plasmalemmas.
2. Dieses wird durch plasmaschädigende, wasserlösliche Stoffe leicht überrannt: die Intrabilität wird pathologisch erhöht, was zum Plasmatot führt.
3. Da sich die Zellen eines Fadens dabei meist ungleich verhalten, ergibt sich das für *Spirogyra* kennzeichnende Bild „bunter Nekrose“.
4. Allgemein sind aber die langen, im Streckungswachstum befindlichen (oder erwachsenen) Zellen noch empfindlicher als die kurzen, im Teilungswachstum befindlichen. Letztere sind resistenter, wie gegen 2 mol Harnstoff (Weber 1951), so auch gegen KCl-Lösung und gegen hyper- und hypotonische Na_2CO_3 -Lösung.

Literatur

- Eibl, K., 1939 a: Das Verhalten der *Spirogyra*-Chloroplasten bei Zentrifugierung. *Protoplasma* 33, 73.
— 1939 b: Plasmolytische Untersuchungen an den Plastiden von *Spirogyra*. *Protoplasma* 33, 161.
Eiselsberg, Claudia v., 1937: Ionenantagonismus und Giftwirkungen an *Spirogyra*. I. Über Ionenantagonismus ein- und zweiwertiger Kationen und deren Giftwirkung auf *Spirogyra*-Zellen. *Biologia generalis* 13, 529.

- Höfler, K., 1951: Plasmolyse mit Natriumkarbonat. Zur Frage des Plasmalemmas bei Süßwasseralgen und bei Gewebszellen von Landblütenpflanzen. *Protoplasma* 40, 426.
- 1955: Zur Kenntnis der Plasmahautschichten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 65, 391.
- Hofmeister, L., 1937: Die Wirkung von Äthylenglykol auf die Plastiden von *Spirogyra*. *Protoplasma* 28, 48.
- Küster, E., 1937: Pathologie der Pflanzenzelle. Teil II. Pathologie der Plastiden. *Protoplasma-Monographien* 15.
- Petit, P., 1880: *Les Spirogyra des environs de Paris*. J. Lechevalier, Paris.
- Schindler, H., 1938 a: Tötungsart und Absterbebild. I. Der Alkalitod der Pflanzenzelle. *Protoplasma* 30, 186.
- 1938 b: Desgl. II. Der Säuretod der Pflanzenzelle. *Protoplasma* 30, 547.
- Toth, A., G. Graf und G. Richter, 1943: „Plasmaamöben“ in geschleuderter *Spirogyra*. *Protoplasma* 37, 300.
- Transeau, E. N., 1951: *The Zygnemataceae*. The Ohio State University Press. Columbus.
- de Vries, H., 1885: Plasmolytische Studien über die Wand der Vakuolen. *Jahrb. wiss. Bot.* 16, 465.
- Weber, F., 1931: Harnstoffpermeabilität ungleich alter *Spirogyra*-Zellen. *Protoplasma* 12, 129.
- 1932: Plasmolyse und „surface precipitation reaction“. *Protoplasma* 15, 522.
- 1935: Alkohol-Resistenz ungleich alter *Spirogyra*-Zellen. *Protoplasma* 20, 15.

Referate.

Danielli, J. F.: Cell Physiology and Pharmacology. 21 Textfiguren, 3 Tafeln, 156 Seiten. New York—Amsterdam: Elsevier Publishing Comp. 1950. \$ 3.—.

Dieses Buch konnte nur ein Forscher schreiben, der auf vielen Gebieten der Biologie und benachbarter Wissenschaften vollkommen zu Hause ist. Danielli, der Zoologe, Pharmakologe, Zellphysiologe, Mediziner, ist ein solcher Forscher. Der biologische Gesichtskreis, den er überblickt, ist ungewöhnlich weit, die Fülle der Tatsachen, die ihm stets gegenwärtig sind, ist reich, und die Fähigkeit, diese Tatsachen zu kombinieren und geistig zu neuer Einsicht zu verknüpfen, ist beneidenswert. Dazu kommt die Begabung zu klarer, eindringlicher Darstellung. So ist es nicht verwunderlich, daß dieses Buch ein ungewöhnlich starker Erfolg geworden ist. Es zeigt wie kaum ein anderes mit zwingender Deutlichkeit die Notwendigkeit gründlicher Kenntnisse in der Zellphysiologie auf, ohne die die Pharmakologie ohne Grundlage arbeitet und nur Zufallstreffer erhoffen darf. Das Buch behandelt in sechs Kapiteln folgende Themen: The Cell as a Physico-Chemical Unit. Possible Actions of Drugs on Surfaces. Membrane Permeability and Drug Action. Enzymes and Drug Action. The Actions of Narcotics. Responses of Cells on the Biological Level. F. Weber (Graz).

Foster, A. S.: Practical Plant Anatomy. XI u. 228 Seiten. D. van Nostrand Company, Inc., Toronto-New York-London. Sec. Edit. (1949), Sec. Print. (1950).

Das Buch ist Lehrbuch und Praktikum zugleich. Es ist in einzelne „Übungen“ unterteilt, deren jede ein bestimmtes anatomisches Gebiet umfaßt. Einer eingehenden Darstellung der Probleme folgt eine Zusammenstellung und Besprechung des Versuchsmaterials und der damit vorzunehmenden Untersuchungen. Besonders wertvoll wird das Buch durch eine jedem Abschnitt folgende reiche Zusammenstellung neuester einschlägiger Literatur. Hervorzuheben ist ein Kapitel, das sich mit der Klassifikation von Zellen und Geweben befaßt und in guter Darstellung die Problematik der verschiedenen morphologischen und physiologischen Zell- und Gewebe-einteilungen behandelt. In einer interessanten tabellarischen Übersicht werden Herkunft, Topographie, strukturelle Charakteristika und Funktionen von zwölf unterschiedenen Hauptzelltypen in Samenpflanzen (Zellen von Vegetationspunkten, Kambien, Epidermis, Parenchym, Kollenchym, Sklerenchym, Fasern, Tracheiden, Gefäßen, Siebröhren, Milchröhren und Kork) dargestellt.

Die Gliederung des Buches folgt im wesentlichen dieser Einteilung. Dazu kommen zwei einführende Kapitel über den lebenden Protoplasten und die Zellwand und drei abschließende über Stamm, Blatt und Wurzel. Als ein Experiment mag es erscheinen, daß dem Buch keine Abbildungen beigegeben sind. Dafür, daß es gelungen ist, spricht, daß der ersten Auflage zwei unveränderte Nachdrucke folgten und die zweite 1949 verbessert und ergänzt erschienene Auflage auch schon im darauffolgenden Jahr einen Neu-
druck erforderte.

R. Biebl (Wien).

Küster, E.: Zytomorphologische Betrachtungen über Regeneration. Ber. Oberhessisch. Ges. Natur- u. Heilkunde, N. F. Naturwiss. Abt. 25, 1952.

Gewiß sind die Tatsachen, über die in diesem Vortrag berichtet wird, im einzelnen meist schon bekannt, sie kommen aber erst dadurch zur Geltung, daß sie ein einheitlicher Gesichtspunkt zu einem wirksamen Bilde zusammenordnet. Man ist heute gewöhnt, das Protoplasma mit den Augen des Chemikers, des Physikers, des Physiologen zu betrachten. Küster zeigt auf, daß die Zelle eine biologische Einheit ist, die Leistungen vollbringt, die wunderbar erscheinen, das heißt heute noch nicht erklärbar sind und es wohl auch morgen noch nicht sein werden. Restitution, Regeneration, Adaptation sind solche Fähigkeiten und Leistungen, die nur die lebende Materie vollbringen kann. Wenn wir dieses Können heute lediglich bestaunen, so soll das nicht zugleich ein Verzicht sein darauf, sie einst auch zu verstehen.

F. Weber (Graz).

Lison, L.: Histochimie et Cytochimie Animales. Principes et Méthodes. Deuxième édition. VI, 608 Seiten. 32 Fig., Gauthier-Villars, Paris 1953.

Die „Histochimie animale“ von Lison ist 1936 zuerst erschienen; sie war damals ein verlässlicher Berater auf dem Gebiete der Cyto- und Histochemie besonders für die Zoologen, die Botaniker hatten zu dieser Zeit „Mikrochemien“ von Molisch und von Tunmann. In den 15 Jahren, die seitdem vergangen sind, hat die Cytochemie ein neues Gesicht bekommen, in dem nun viele Züge sich wesentlich klarer abzeichnen als früher. Den Botanikern steht kaum ein Buch zur Verfügung, das die großen Fortschritte des letzten Dezenniums berücksichtigt, den Zoologen ist in der zweiten Auflage des „Lison“ ein sicherlich sehr begrüßter Helfer entstanden. Schon die Änderung des Titels bringt es zum Ausdruck, daß das neue Buch nicht nur eine neue Auflage des früheren ist, sondern ein Werk, das neu geschrieben ist und besonders die jungen und jüngsten Methoden der Cytochemie eingehend zur Darstellung bringt. Dabei hat das neue Buch die großen Vorzüge des alten bewahrt und noch weiter verstärkt. Es sind dies vor allem strenge kritische Sichtung und vorbildliche Klarheit in der Darlegung der in überreicher Fülle gegebenen Methoden und Verfahren. Die Botaniker werden die Zoologen um dieses Buch beneiden, und sie werden gut daran tun, es selbst zu Rate zu ziehen, denn viele, ja beinahe die meisten der Prinzipien und Methoden der Cytochemie haben ja für die Pflanzenzelle ebenso Geltung wie für die tierische.

F. Weber (Graz).

Wilson, W. L.: The rigidity of cell cortex during cell division. J. Cell. and Comp. Physiol. 38, 1951, 409—416.

An Eiern des Anneliden *Chaetopterus pergamentaceus* wurde die relative Rigidität der corticalen Plasmaschicht bestimmt, indem beobachtet wurde, welche Zentrifugalkraft eine Verlagerung der Granula aus der corticalen Schicht in das Binnenplasma bedingte. Nach der Befruchtung nimmt die Rigidität des corticalen Plasmas ab, steigt dann von der 6. bis zur 11. Minute wieder ungefähr auf den früheren Wert an, fällt dann von der 35. bis zur 40. Minute wieder ab und bleibt so bis zur Zellteilung. Wie aus einer Arbeit von Heilbrunn und Wilson aus dem Jahre 1948 hervorgeht, macht das Binnenplasma ähnliche Viskositätsänderungen durch, nur schließt sich in ihm eine Viskositätszunahme vor und während der Teilung an.

K. Umrath (Graz).

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Windisch, F., D. Stierand und H. Haehn: Über den Nachweis der Zellphosphate und die Unspezifität der bisher gebräuchlichen histochemischen Methoden zur Lokalisierung der Ribonukleotide.....	19. 7. 1952
Bancher, E.: <i>Paeonia</i> -Blüte und ihr zellphysiologisches Verhalten während des Abblühens	30. 8. 1952
Weber, F.: Hypotonie-Resistenz-Unterschiede von Blütenblättern.....	2. 11. 1952
Gillissen, G.: Die Fällungsmetachromasie.....	14. 2. 1953
Laber, Ilse: Entwicklung und Nekrose einiger kurzlebiger Pflanzenhaare ..	27. 2. 1953
Casari, K.: Über den Plasmolytikumwechsel-Effekt.....	27. 2. 1953
Schittengruber, Brigitte: Stomata fehlen den Blattflecken von <i>Maranta leuconeura</i>	28. 2. 1953
Perner, E. S.: Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen.....	6. 3. 1953
Stockinger, L.: Das Kernkörperchen.....	11. 3. 1953
Cohen, M., and E. Bowler: Lamellar Structure of the Tobacco Chloroplast	18. 3. 1953
Hürtel, O., und Irmtraud Thaler: Die Proteinoplasten von <i>Helleborus corsicus</i> Willd.	21. 3. 1953
Kuhl, W.: Zeitrafferfilm-Untersuchungen über die Wirkung von Zentrifugierung und Pressung auf die Cytoplasmastrukturen, den Plasmogamieablauf und die Zellrestitution bei <i>Actinosphaerium eichhorni</i> EHRBG.....	26. 3. 1953
Wiede, Margot: Über den Einfluß pharmakologischer Reize auf das Zellbild der Streifenstücke	10. 4. 1953
Weber, F., und Griseldis Kenda: Rasche Vakuolenkontraktion in <i>Pulmonaria</i> -Blütenzellen.....	11. 4. 1953
Wohlfarth-Bottermann, K. E., F. Krüger und K. G. Grell: Protistenstudien VI. Die Feinstruktur der Axopodien und der Skelettnadeln von Heliozoen. (Zugleich ein Beitrag zur sublichtmikroskopischen Struktur des Protoplasmas)	23. 4. 1953
Essner, E. S.: The Breakdown of Isolated Yolk Granules by Cations	28. 4. 1953
Hilmbauer, K.: Zellphysiologische Studien an Euglenaceen, besonders an <i>Trachelomonas</i>	5. 5. 1953
Miličević, D.: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in <i>Opuntia brasiliensis</i>	12. 5. 1953
Umrath, K.: Über die elektrische Polarisierbarkeit von <i>Nitella mucronata</i> und <i>Nitella opaca</i>	1. 6. 1953
Freytag, K.: Der submikroskopische Bau der Deckhaare von <i>Lamium galeobdolon</i> Crantz	15. 6. 1953
Saguchi, S.: On the Fundamental Structure of Protoplasm	27. 6. 1953
Hofmeister, L.: Mikrurgische Untersuchung über die geringe Fusionsneigung plasmolysierter, nackter Pflanzenprotoplasten	4. 7. 1953
Strugger, S.: Die Proplastiden in den jungen Blättern von <i>Agapanthus umbellatus</i>	10. 7. 1953

SPRINGER-VERLAG IN WIEN I

ARCHIV FÜR DIE GESAMTE VIRUSFORSCHUNG

Herausgegeben von

R. Doerr † und **C. Hallauer**
Basel Bern

Soeben erschienen:

Band V, Heft 2. (Abgeschlossen im März 1953.) Mit 15 Textabbildungen.
96 Seiten. 1953. S 78.—, DM 15.60, \$ 3.75, sfr. 16.—

Inhaltsverzeichnis: Verlinde, J. D., E. de Vries and A. Kret. Destruction of Myelin in the Central Nervous System of Experimental Animals by Enzymatic Activity of Vaccinia Virus. — Vivell, O. und J. Schairer. Typenbestimmungsversuche bei in Deutschland isolierten Coxsackievirusstämmen. — Johnsson, T. und J. Lindahl. Herpangina. — Gard, S. Studies in the Epidemiology of Poliomyelitis I. — Gard, S. and Karin Agren. Studies in the Epidemiology of Poliomyelitis II. — Raettig, H. und Aletta Buse. Erfolgreiche Versuche zur Isolierung eines Typhusvirus nach Magrassi.

HANDBUCH DER VIRUSFORSCHUNG

Herausgegeben von

Prof. Dr. **R. Doerr** † und Prof. Dr. **C. Hallauer**
Basel Bern

II. Ergänzungsband

Mit 187 Abbildungen im Text. VIII, 425 Seiten. Lex.-8°. 1950.

S 332.—, DM 66.—, \$ 15.80, sfr. 68.50
Ganzleinen S 347.—, DM 69.—, \$ 16.50, sfr. 72.—.

Inhalt: Feller, A. E., Cleveland, O. Technic and Application of Roller Tube Cultures. — Flosdorf, E. W., Forest Grove, Pa. Technic and Application of Drying of Viruses in the Frozen State. — Kaiser, M., Wien, und P. Vonwiller, Rheinau. Die Auflicht- und Dunkelfeldmikroskopie in der Virusforschung. — Burnet, F. M., Melbourne. Variation in Influenza Viruses. — Francis, Th. Jr., Ann Arbor, Mich. Immunity and Vaccination in Influenza. — Eaton, M. D., Boston, Mass. Virus Pneumonia and Pneumonitis Viruses of Man and Animals. — Hallauer, C., Bern. Die Haemagglutination durch Virusarten. — Ruska, H., Berlin-Dahlem. Die Elektronenmikroskopie in der Virusforschung. — Sachverzeichnis.

Aus den Besprechungen:

„... Beinahe die Hälfte des ganzen Bandes füllt eine Darstellung von Ruska über die Elektronenmikroskopie in der Virusforschung, mit 163 größtenteils wundervollen Abbildungen. Es ist auch die ganze Technik der Elektronenmikroskopie eingehend geschildert. Jeder Arbeit ist ein meistens recht umfassendes Schrifttum angefügt.“

Dieser Band ist eine äußerst willkommene Bereicherung unserer Literatur, zumal da hier auch die uns vielfach so sehr schwer zugängliche ausländische Literatur ausgiebigst berücksichtigt ist ...“

Zbl. f. allgemeine Pathologie

Das Handbuch der Virusforschung, Erste Hälfte 1938, Zweite Hälfte 1939, sowie der erste Ergänzungsband 1944, sind vergriffen. Das Werk wird in Ergänzungsbänden fortgesetzt.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

